



Уральский
федеральный
университет

имени первого Президента
России Б.Н.Ельцина

Институт естественных наук
и математики

**О. С. АРТАШЯН
В. А. МИЩЕНКО
Е. Л. ЛЕБЕДЕВА**

БИОФИЗИКА

Учебно-методическое пособие



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА РОССИИ Б. Н. ЕЛЬЦИНА

О. С. Арташян, В. А. Мищенко, Е. Л. Лебедева

БИОФИЗИКА

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано
методическим советом Уральского федерального университета
в качестве учебно-методического пособия для студентов вуза,
обучающихся по направлению подготовки 06.03.01 «Биология»,
по специальностям 30.05.01 «Медицинская биохимия»,
30.05.02 «Медицинская биофизика»

Екатеринбург
Издательство Уральского университета
2019

УДК 577.3(075.8)
ББК 28.07я73
А86

Р е ц е н з е н т ы:

лаборатория биологической подвижности
Института иммунологии и физиологии УрО РАН
(заведующий лабораторией доктор биологических наук
С. Ю. Бершицкий);

Л. Б. Кацнельсон, доктор физико-математических наук, доцент,
ведущий научный сотрудник лаборатории математической физиологии
Института иммунологии и физиологии УрО РАН

Под общей редакцией
О. С. Арташян

Арташян, О. С.

А86 Биофизика : учеб. -метод. пособие / О. С. Арташян, В. А. Мищенко, Е. Л. Лебедева; [под общ. ред. О. С. Арташян] ; М-во науки и высш. образования Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. — Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2019. — 114 с.

ISBN 978-5-7996-2621-1

В учебно-методическом пособии рассмотрены основные биофизические принципы из разных разделов курса: от биофизики сложных систем до частной биофизики. Освещены вопросы термодинамики биологических процессов, методы атомной физики в применении к биологическим системам, молекулярной и клеточной биофизики. Приведены методические рекомендации к лабораторным занятиям, которые содержат теоретический блок и иллюстративный материал, а также вопросы и задания по рассмотренным темам.

Пособие предназначено для студентов биологических и медицинских специальностей вузов.

УДК 577.3(075.8)
ББК 28.07я73

На обложке:

Ж. Л. Давид. Портрет Лавуазье и его жены Мари-Анны, 1788

ISBN 978-5-7996-2621-1

© Уральский федеральный университет, 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	4
Тема 1. Биофизика сложных систем. Термодинамика биологических процессов	
Лабораторная работа 1. Биоэнергетика и метаболизм	5
Лабораторная работа 2. Определение основного обмена. Дыхательный коэффициент	23
Тема 2. Атомная физика и квантовая механика в применении к биологическим системам	
Лабораторная работа 3. Количественный спектрофотометрический анализ	39
Лабораторная работа 4. Рентгеновская компьютерная томография	45
Тема 3. Молекулярная биофизика	
Лабораторная работа 5. Изучение пространственной структуры белка на компьютерной модели	57
Лабораторная работа 6. Изучение интенсивности перекисного окисления липидов по содержанию ТБК-реактивных продуктов в плазме крови	65
Тема 4. Биофизика клетки	
Лабораторная работа 7. Биофизика мембран. Кислотный и щелочной гемолиз эритроцитов	70
Лабораторная работа 8. Биофизика мышечного сокращения. Электромиография. Пополнение двигательных единиц. Утомление	78
Тема 5. Методы биофизики	
Лабораторная работа 9. Капиллярный электрофорез	94
Примерный перечень вопросов для подготовки к экзамену по курсу «Биофизика»	106
Библиографические ссылки	110
Список рекомендуемой литературы	111

ПРЕДИСЛОВИЕ

Биофизика — междисциплинарная наука, находящаяся на стыке биологии, физики, химии и математики. В настоящее время биофизика наряду с другими отдельными биологическими направлениями (молекулярная биология, биохимия, физиология и др.) является базой фундаментального курса наук о жизни. Современная биофизика достигла крупных успехов в изучении и объяснении ряда биологических явлений, проявляющихся на разных уровнях организации живого. Реализованы общетеоретические подходы к явлениям жизни, основанные на термодинамике, теории информации, авторегуляции и др.

Учебно-методическое пособие «Биофизика» предназначено для проведения лабораторных и практических занятий по дисциплине «Биофизика» у студентов 3–4 курсов биологических, физических, медицинских, фармацевтических, сельскохозяйственных специальностей высшей школы.

Настоящее учебно-методическое пособие составлено согласно действующему федеральному государственному образовательному стандарту и рабочей программе по учебной дисциплине «Биофизика».

Материал по каждому занятию предваряется изложением кратких теоретических положений, которые дают объяснение физико-химическим основам биологических явлений.

Представленные в пособии материалы не являются заменой лекционного курса и основных существующих учебников, а будут полезны в качестве дополнения на этапах изучения биофизики, для качественного выполнения лабораторных и практических работ, написания рефератов, подготовки к экзаменам и зачетам, для повторения материала по предмету при изучении последующих дисциплин образовательной программы.

ТЕМА 1. БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ. ТЕРМОДИНАМИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Лабораторная работа 1

БИОЭНЕРГЕТИКА И МЕТАБОЛИЗМ

(работа выполняется на учебном комплексе
«Biopac Student Lab»)

В основе жизни лежит обмен веществ, который сопровождается процессами превращения энергии. Для понимания этих процессов необходимы знания основ биоэнергетики и термодинамики.

Обмен веществ состоит из двух взаимосвязанных процессов:

- часть общего обмена веществ, при котором идет усвоение, поглощение, синтез, называется *анаболизмом (ассимиляцией)*;
- часть общего обмена веществ, при котором идет разрушение, распад и выделение, называется *катаболизмом (диссимиляцией)*.

Пластический обмен — совокупность реакций синтеза органических веществ, из которых образуются структуры клетки, обновляется ее состав, а также синтезируются ферменты, необходимые для ускорения химических реакций в клетке. Синтез сложного органического вещества — белка — из менее сложных органических веществ — аминокислот — пример пластического обмена.

Взаимосвязь пластического и энергетического обмена: пластический обмен предоставляет для энергетического обмена органические вещества и ферменты, а энергетический обмен предоставляет для пластического — энергию, без которой не могут идти реакции синтеза. Нарушение одного из видов клеточного обмена ведет к нарушению всех процессов жизнедеятельности, т. е. к гибели организма.

Энергия необходима для механической работы при сокращении мышц, для электрической работы — при генерации и передаче нервных импульсов, для осмотической работы — при секреции, ресорбции и фильтрации веществ на клеточных мембранах, для химической работы — при образовании новых химических связей между атомами в процессах биосинтеза сложных органических соединений.

Источником энергии для всех видов биологической работы служит потенциальная химическая энергия, заключенная в молекулах пищевых веществ. Она высвобождается в процессе обмена веществ и при помощи специальных молекулярных устройств преобразуется в различные другие виды энергии.

Каждое органическое соединение обладает запасом энергии, которую называют свободной энергией. В процессе реакции идет преобразование энергии между веществами. Главным носителем свободной энергии в веществе являются химические связи между атомами. Если химическая связь имеет энергию 12,5 кДж/моль, то такая связь по энергетическому обеспечению называется нормальной. Если при разрыве химической связи выделяется энергия 25–50 кДж/моль, то такая связь называется макроэргической и обозначается символом «~» (знак «тильда»).

Э н е р г и я — это способность производить работу. Различают потенциальную энергию, зависящую от положения или состояния тела, и кинетическую энергию, т. е. энергию движения.

В живом организме *потенциальная энергия* представлена, главным образом, в форме химической энергии связей между атомами в молекулах биоорганических соединений. Например, количество потенциальной энергии, заключенной в связях между атомами С, Н и О в молекуле глюкозы, составляет около 285 тыс. Дж на 1 моль вещества. Потенциальная энергия химических связей обусловлена расположением валентных электронов на орбитах с высоким энергетическим уровнем, куда они попадают при образовании молекул биоорганических соединений в процессе химических реакций. При метаболических превращениях, совершающихся в живом организме, электроны, образующие химические связи в молекулах первичных веществ, переходят с более высокого на более низкий энергетический уровень.

Кинетическая энергия потока электронов, переходящих по энергетическим уровням, в дальнейшем может быть использована для образования новых химических связей или же с помощью специальных биологических преобразователей превратиться в другие виды кинетической энергии: тепловую, механическую, электрическую, электромагнитную и т. д.

Постоянное взаимодействие этих двух видов энергии обусловливает способность организма поддерживать разнообразные жизненные функции.

Первичным источником энергии для всех биологических процессов на Земле служит солнечный свет, лучистая энергия которого возникает в недрах Солнца из ядерной энергии превращения атомов водорода в атомы гелия с выделением энергии в виде гамма-лучей. В результате взаимодействия гамма-лучей с электронами снова выделяется энергия в виде фотонов солнечного света.

На Земле лучистая энергия солнечного света улавливается содержащимся в хлоропластах зеленых растений пигментом хлорофиллом и превращается в ходе реакций фотосинтеза в химическую энергию, которая используется для синтеза из двуокиси углерода и воды углеводов и других сложных биоорганических соединений. Таким образом, энергия солнечного света, представляющая собой один из видов кинетической энергии, превращается в один из видов потенциальной энергии.

Энергия, накопленная в химических связях биоорганических молекул, может высвободиться только в процессе реакций обмена веществ. В организмах животных, питающихся растениями, химическая энергия углеводов и других питательных веществ выделяется в процессе биологического окисления в количестве, соответствующем энергии, израсходованной на синтез этих веществ при фотохимических реакциях в зеленых растениях. Одна часть энергии, выделяющейся при биологическом окислении, превращается в доступную для дальнейшего использования энергию макроэргических фосфатных связей АТФ, другая превращается в тепло и не может быть использована в дальнейшем. Процессы, связанные с образованием макроэргических фосфатных связей, осуществляются в митохондриях.

Науку, изучающую трансформацию энергии в живых системах, называют **биоэнергетикой**. Теоретической базой биоэнергетики является **химическая термодинамика**.

В термодинамику вводится понятие **системы**, которая представляет собой совокупность веществ, находящихся во взаимодействии, но мысленно обособляемых от окружающей среды. Особенность систем, рассматриваемых в термодинамике, заключается в том, что они состоят из очень большого числа частиц — молекул или атомов. Все лежащие за пределами системы называются **окружающей средой**.

Системы делятся на:

- *изолированные (замкнутые)*, не обменивающиеся с окружающей средой ни веществом, ни энергией;
- *закрытые* — обмениваются с внешней средой только энергией;
- *открытые*, для которых возможен обмен веществом и энергией с окружающей средой. Энергия может переходить из системы в окружающую среду и в обратном направлении.

Величины, определяющие состояние системы, называются ее параметрами. Параметры системы часто делят на *интенсивные* (не зависящие от общего количества вещества в системе — температура и давление) и *экстенсивные* (зависящие от количества вещества — объем, масса, энергия). Характеристику перехода системы из одного состояния в другое можно дать такими термодинамическими функциями, как внутренняя энергия (U или E), энтальпия (H — термодинамическая величина, характеризующая энергию системы), энтропия (S — внутренняя энергия замкнутой системы) и свободная энергия (энергия Гиббса — G). Поскольку для живых систем трудно определить абсолютные значения E , H , S и G , обычно говорят об изменениях функций состояния системы: ΔU , ΔH , ΔS и ΔG .

Процессы преобразования энергии в системе подчиняются **законам термодинамики**.

Первый закон термодинамики

Каждая система обладает определенным запасом энергии, называемой внутренней энергией. Внутренняя энергия системы представляет собой сумму энергий всех видов движений (поступательного, вращательного, колебательного) частиц системы (молекул, ионов, ядер).

Внутренняя энергия — это полная энергия системы за вычетом потенциальной, обусловленной воздействием на систему внешних силовых полей (в поле тяготения), и кинетической энергией движущейся системы.

Запас внутренней энергии определяется природой вещества, его массой и состоянием системы. Полную внутреннюю энергию (абсолютное значение внутренней энергии) определить невозможно. Экспериментально можно определить только изменение внутренней энергии при переходе ее из одного состояния в другое:

$$\Delta U = U_2 - U_1,$$

где ΔU — приращение внутренней энергии; U_1 и U_2 — внутренняя энергия начального (исходного) и конечного состояний.

Теплота, подведенная к закрытой системе, расходуется на изменение внутренней энергии системы и совершение работы — формулировка первого закона термодинамики для процесса, протекающего при постоянном давлении, который является законом сохранения энергии и описывается уравнением

$$Q_p = \Delta U + A,$$

где Q_p — теплота изобарного процесса; ΔU — приращение внутренней энергии; A — работа.

Впервые понял и доказал эквивалентность понятий теплоты и работы и сформулировал первое начало термодинамики (1842) немецкий врач Р. Майер.

В термодинамике обычно принимается, что теплота, отданная системой в окружающую среду, отрицательна, а полученная системой из окружающей среды — положительна. Для работы приняты противоположные знаки. Работа, совершенная системой

над окружающей средой, — положительна, а работа, совершенная со стороны окружающей среды над системой, — отрицательна.

При постоянном давлении меняется объем и становится неизбежной работа расширения (сжатия):

$$A = p\Delta V,$$

где $\Delta V = V_2 - V_1$ — приращение объема системы, равное разности объемов в системе.

Подставив в уравнение первого закона термодинамики величину работы расширения (сжатия), получим следующее уравнение:

$$Q_p = \Delta U + p\Delta V.$$

Исходя из этого уравнения, *э н т а л п и я* — это функция состояния системы, приращение которой равно теплоте, полученной системой в изобарном процессе. Энтальпия описывается уравнением

$$\Delta H = Q_p.$$

Абсолютное значение величины энтальпии, как и внутренней энергии, измерить невозможно, поэтому измеряют изменение энтальпии в ходе процесса. Энтальпия отличается от внутренней энергии на работу расширения — $p\Delta V$:

$$\Delta H = \Delta U + p\Delta V.$$

При изучении возможности самопроизвольного протекания процесса была выявлена закономерность: система стремится к переходу в состояние с наименьшей энергией (при изобарном процессе). Данную тенденцию называют *энтальпийным фактором*. Процесс самопроизвольно протекает в сторону выделения теплоты (*принцип Бергто*).

Работа расширения процесса, протекающего при постоянном объеме (изохорный процесс), будет иметь следующий вид:

$$Q_V = \Delta U.$$

Это уравнение представляет математическое выражение первого закона термодинамики для изохорного процесса. Следовательно,

внутренняя энергия — это функция состояния системы, приращение которой равно теплоте, полученной системой в изохорном процессе.

Второй закон термодинамики

Функции «внутренняя энергия» и «энтальпия» не дают однозначного ответа на вопрос о возможности самопроизвольного протекания процесса. При изменении внутренней энергии системы максимальному значению работы будет соответствовать минимальное значение теплоты (по абсолютной величине). Отношение этой минимально возможной теплоты к температуре, при которой осуществляется изотермический процесс, называется *приведенной теплотой*.

Э н т р о п и я представляет собой функцию состояния системы, приращение которой (ΔS) равно теплоте (Q_{\min}), подведенной к системе в изотермическом процессе, деленной на абсолютную температуру (T), при которой осуществляется процесс:

$$\Delta S \geq Q_{\min}/T,$$

где Q_{\min} — минимальное приращение теплоты, подведенное к системе.

Представленное уравнение является математическим выражением второго закона термодинамики. Знак «>» соответствует необратимому (реальному) процессу, а знак «=» — обратимому (идеальному).

Основная идея, заложенная во втором начале термодинамики, заключается в неизбежности диссипации энергии в форме теплоты по причине асимметрии переходов «теплота ↔ работа» и «работа ↔ теплота» на молекулярно-кинетическом уровне.

Различные виды энергии стремятся превратиться в теплоту, а теплота стремится рассеяться, т. е. теплоту нельзя полностью превратить в работу — формулировка второго закона термодинамики.

Так была выявлена закономерность: *система стремится к переходу из более упорядоченного (менее вероятного) состояния в менее упорядоченное (более вероятное)*. Энтропию представляют как меру неупорядоченности системы, а количество переданной системе

теплоты оценивают произведением $T\Delta S$ и называют *энтропийным фактором*:

$$Q = T\Delta S.$$

Передача энергии в форме теплоты характеризуется произведением двух факторов: интенсивного – T (зависящего от величины самого фактора) и экстенсивного ΔS (зависящего от длительности процесса и размеров системы).

Энтропия зависит от агрегатного состояния вещества. При переходе веществ из газообразного состояния в твердое энтропия уменьшается. При испарении, диффузии, растворении кристаллов, при химических взаимодействиях, приводящих к увеличению числа частиц объема, энтропия процесса увеличивается.

Переход систем из менее упорядоченного состояния в более упорядоченные (конденсация, сжатие, полимеризация) приводит к уменьшению энтропии ($\Delta S < 0$) и противодействует самопроизвольному протеканию процесса.

Итак, система стремится к состоянию с минимальной энергией ($\Delta H < 0$ и $E < 0$) и максимальной неупорядоченностью системы ($\Delta S > 0$). При других сочетаниях характера изменений функций состояния системы возможность самопроизвольно протекающего процесса определяет либо энтальпийный, либо энтропийный фактор. В качестве критерия самопроизвольности процесса введена новая функция – свободная энергия.

Энергия Гиббса. Химический потенциал. Источники энергии

Свободная энергия (энергия Гиббса) – это функция состояния системы, изменение которой равно полной работе процесса за вычетом работы расширения:

$$G = U + pV - TS.$$

Подставляя выражение $\Delta H = \Delta U + p\Delta V$, получаем уравнение Гиббса:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S.$$

Слагаемое ΔH называется энтальпийным членом, слагаемое $T\Delta S$ — энтропийным членом.

В конкретных реакциях возможно любое сочетание знаков для ΔH и ΔS .

1. $\Delta H < 0$ и $\Delta S > 0$ — условие самопроизвольного протекания процесса;

2. $\Delta H > 0$ и $\Delta S < 0$ — процесс самопроизвольно не протекает.

На основе энергии Гиббса второе начало термодинамики можно выразить следующим образом: *в изобарно-изотермических условиях ($p, T = \text{const}$) в системе самопроизвольно могут осуществляться только такие процессы, в результате которых энергия Гиббса системы уменьшается.*

Условие $\Delta G < 0$ означает, что реакция идет самопроизвольно в закрытой системе при условии уменьшения энергии Гиббса. В состоянии равновесия энергия системы не изменяется ($\Delta G = 0$).

Работа, производимая системой в необратимом процессе, всегда будет меньше работы, производимой в обратимом процессе. Открытые системы обмениваются с окружающей средой энергией и массой. Поэтому для них ΔG является не только функцией T, P, V , но и функцией концентрации компонентов системы. Свободная энергия (энергия Гиббса) системы может быть рассчитана как сумма энергий Гиббса, составляющих систему частиц (компонентов системы). Для таких расчетов используется химический потенциал вещества (μ).

Химическим потенциалом вещества в данной системе называется величина, определяемая энергией Гиббса, приходящейся на моль этого вещества при заданных условиях:

$$\mu(X) = G(X)/n(X),$$

где $\mu(X)$ — химический потенциал вещества (X), Дж/моль; $G(X)$ — энергия Гиббса вещества (X), Дж/моль; $n(X)$ — количество вещества (X), моль.

Исходя из уравнения Гиббса, в живой клетке общая энергия системы, равная ее теплосодержанию, складывается из свободной энергии, необходимой для совершения работы, и связанной энергии ($T\Delta S$), представляющей собой ту часть энергии, которая теряется

системой, и являющейся, как уже было ранее сказано, мерой необратимости процесса. Изменения энтропии и свободной энергии связаны строгой зависимостью: повышение энтропии при необратимой реакции сопровождается снижением свободной энергии. Все химические процессы протекают самопроизвольно с уменьшением ΔG до тех пор, пока не будет достигнуто состояние равновесия, для которого характерно минимальное значение свободной энергии и максимальный уровень энтропии.

Для живых организмов характерна высокая сложность биоорганических молекул и упорядоченность их внутренней структуры, поэтому их энтропия невелика. Создавать и поддерживать такую упорядоченность живые организмы могут только за счет увеличения энтропии окружающей среды. Они получают из окружающей среды энергию в том виде, в каком могут ее использовать, и затем возвращают в среду эквивалентное количество энергии в менее пригодном виде. Энергия, возвращаемая живыми организмами во внешнюю среду, обычно выделяется в форме тепла. Это ведет к уменьшению упорядоченности среды, т. е. к повышению ее энтропии.

Энергия, ранее накопленная в химических связях биоорганических молекул, может высвобождаться только в ходе реакций обмена веществ. Таким образом, обмен веществ тесно связан с обменом энергии.

В организме животных, питающихся растениями, химическая энергия углеводов и других питательных веществ выделяется в процессе биологического окисления, являющегося частью катаболизма, в количестве, эквивалентном энергии, израсходованной на синтез этих веществ в зеленых растениях.

Одна часть энергии, выделяющейся при биологическим окислении, превращается в доступную для использования энергию макроэргических фосфатных связей аденозинтрифосфата (АТФ) (свободная энергия, характеризующая ту часть внутренней энергии системы, которая может быть использована для совершения различных видов работы), другая превращается в тепло (связанная энергия) и не может быть использована в дальнейшем (рис. 1).

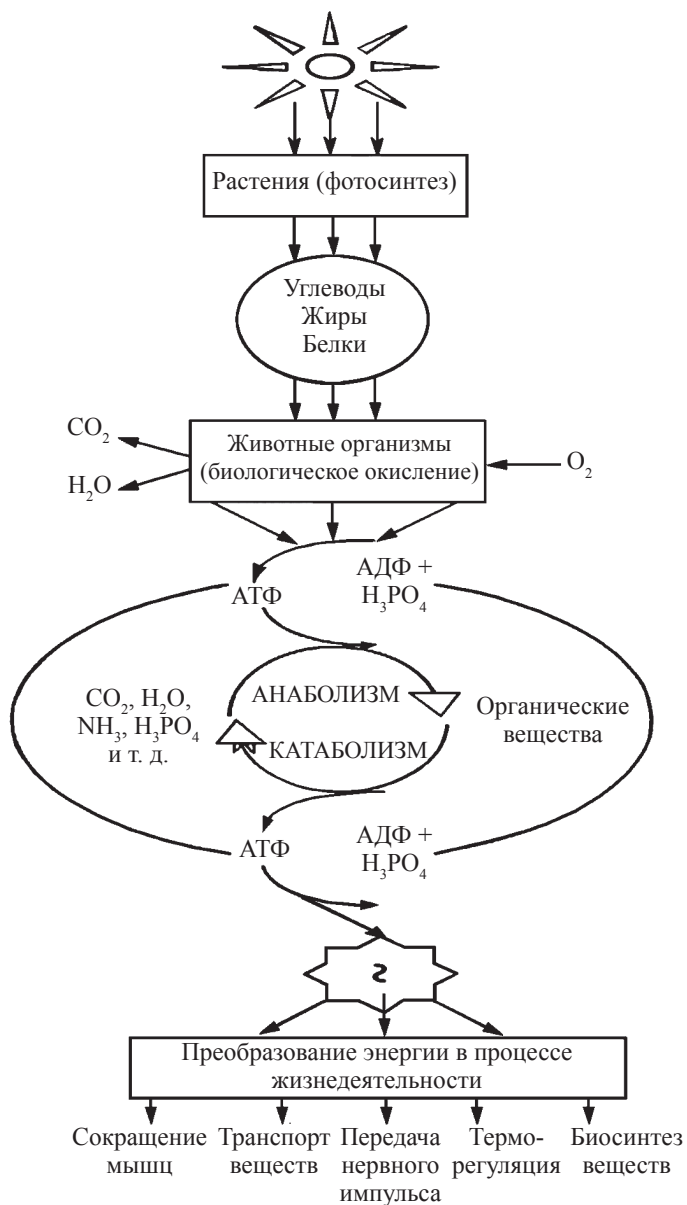


Рис. 1. Пути преобразования энергии в биологических объектах

Живые организмы используют разные источники питательных веществ и энергии. По источникам питания живые организмы делятся на две большие группы — *автотрофы*, использующие CO_2 в качестве исходного питательного материала для построения различных углеродсодержащих органических веществ, и *гетеротрофы*, которые используют углерод в виде готовых достаточно сложных органических соединений (например углеводов).

По отношению к источникам энергии живые организмы делятся на *фототрофов*, для которых источником энергии служит солнечный свет, и *хемотрофов*, потребляющих энергию окислительно-восстановительных реакций.

Как фототрофов, так и хемотрофов можно, в свою очередь, разделить на группы в зависимости от того, какие вещества являются донорами электронов в окислительно-восстановительных процессах: у литотрофов таковыми служат неорганические соединения, у органотрофов — органические.

Хемотрофные организмы группируют и по виду акцепторов электронов. В тех случаях, когда для окисления используется кислород, имеет место аэробный или дыхательный тип энергетики. При анаэробном типе энергетического обмена (брожении) в роли окислителя выступает не кислород, а ряд других веществ (пируват, ацетальдегид и др.). Часто клетки высших организмов и бактерии имеют оба типа энергетики — анаэробный и аэробный, поэтому их называют факультативными анаэробами, хотя степень зависимости от кислорода у них различна. Например, высшие организмы без него долго обходиться не могут.

Вследствие многообразия форм питания и потребления энергии живые организмы в природе тесно связаны друг с другом. Эту взаимосвязь в питании и использовании разнообразных источников энергии можно представить в виде своеобразных энергетических циклов живой природы. Главные партнеры этого цикла — Солнце, как источник энергии, автотрофы, улавливающие энергию солнечного света и синтезирующие из CO_2 и H_2O (при наличии источников атомов азота) углеводы и прочие органические вещества, и животные, потребляющие органические вещества и кислород, производимые фототрофами.

Для животных организмов, относящихся к хемоорганотрофам, основным источником энергии является энергия, содержащаяся в химических связях пищевых продуктов. Поэтому питание служит центральным фактором окружающей среды, определяющим жизнедеятельность. Чем выше энергозатраты организма, тем, естественно, больше потребность в пищевых продуктах. Большая часть энергии расходуется на биосинтез веществ: белков, липидов, углеводов и АТФ. Меньшая часть используется для поддержания работы сердца и дыхательных мышц, транспорта веществ. Значительно увеличивается расход энергии при выполнении напряженной физической работы.

Ц е л ь р а б о т ы: пронаблюдать и зарегистрировать изменения в дыхании, теплообмене, электрической активности сердца, вызванные коррекцией метаболических потребностей организма при изменении уровня активности.

О б о р у д о в а н и е и м а т е р и а л ы

Компьютер; программное обеспечение «Biopac Student Lab»; основной блок системы BIOPAC (MP36 с кабелями и блоком питания); датчик потока воздуха со сменным стерилизуемым наконечником (SS11LA); одноразовый загубник и бактериальный фильтр; зажим для носа; датчик температуры (SS6L); клейкая лента односторонняя; набор электродных проводов (SS2L); одноразовые виниловые электроды (3 электрода на человека); электродный гель и очищающее средство для кожи или спиртосодержащий препарат.

Х о д р а б о т ы

1. Проверьте подключение оборудования к основному блоку в соответствии с рис. 2.
2. Включите компьютер и основной блок.
3. Выберите пациента.

Внимание! У пациента не должно быть сердечно-сосудистых и дыхательных заболеваний.

4. Присоедините загубник к бактериальному фильтру и полуженную сборку присоедините к датчику потока воздуха со стороны метки «Inlet».

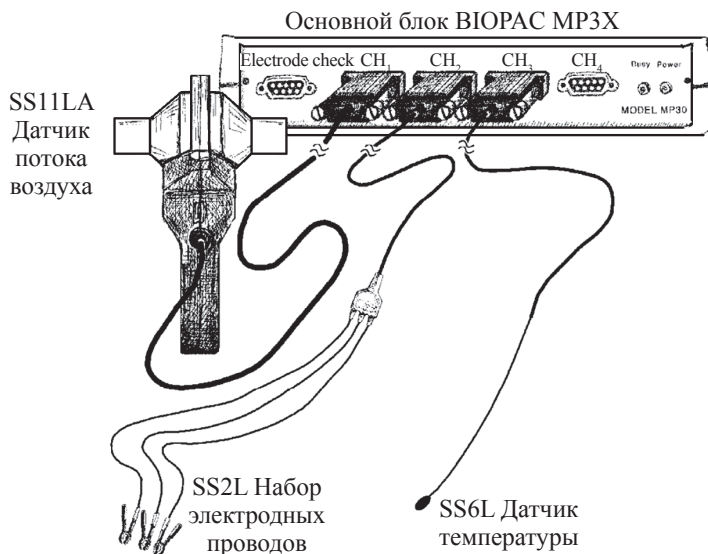


Рис. 2. Схема подключения оборудования к основному блоку ВІОРАС

5. Расположите три электрода на пациенте в соответствии с рис. 3. Присоедините к электродам электродные провода.

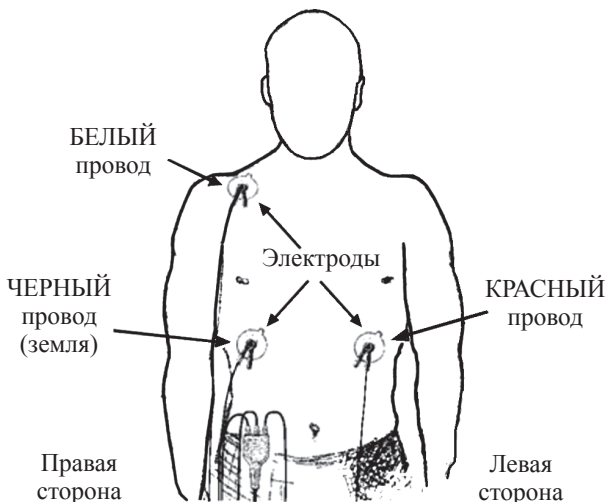


Рис. 3. Схема расположения электродов на пациенте

6. С помощью клейкой ленты закрепите датчик температуры на кончике пальца.

7. На компьютере запустите программу «Biopac Student Lab», выберите урок «Физиология аэробных упражнений», присвойте уникальное имя файлу лабораторной работы.

8. Проведите процедуру *калибровки*. Пациент должен быть ослабленным во время процедуры калибровки и нормально дышать через датчик потока воздуха. Кнопка «Калибровка» находится в верхнем левом углу окна программы. После нажатия на кнопку начнется процесс калибровки. Процедура калибровки продлится 8 секунд и остановится автоматически. Запись должна быть подобна рис. 4. Если данные соответствуют рисунку, нужно перейти к разделу регистрации данных, при несоответствии — повторить процедуру калибровки нажатием на кнопку «Повтор калибровки».

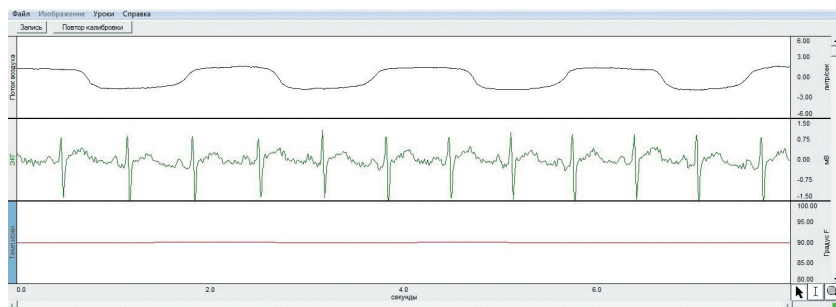


Рис. 4. Правильная запись процедуры калибровки

9. Приготовьтесь к регистрации. Проверьте прикрепление электродов и датчика температуры. Рассчитайте максимально допустимую частоту сердечных сокращений (ЧСС), которую пациент не должен превышать во время упражнений:

$$0,8 \cdot [220 - (\text{возраст})] = \text{максимальная ЧСС пациента.}$$

10. Нажмите на кнопку «Запись» и начните регистрацию данных. Спустя 10 секунд регистратор должен попросить пациента начать упражнения. С помощью кнопки F9 поставьте первую метку событий «Начало упражнений». Через 5 минут пациент заканчивает

упражнения, регистратор ставит вторую метку событий «Остановка». Регистрация данных продолжается в течение 5 минут после прекращения упражнений.

11. Нажмите кнопку «Приостановить». Если данные соответствуют рис. 5, то нажмите на кнопку «Выполнено», отключите датчики и снимите электроды.

12. В меню «Lessons» выберите опцию «Обзор записанных данных». Переходите к анализу полученных результатов.

Настройте окно данных для оптимального отображения полученных данных. Установите каналы вычислений:

- CH41 («Значение») — отображает величину амплитуды для канала в момент, выделенный I-образным курсором. Если выбрана единственная точка, то величина соответствует ей, если же выделен участок — то амплитуде в его конечной точке;

- CH1 («1/мин») — вычисляет разницу между временем начала и конца выделенного I-образным курсором участка (Δt) и делит полученную величину на 60 секунд;

- CH1 («Максимум») — находит максимальное значение амплитуды на выделенном I-образным курсором участке;

- CH3 («Значение»).

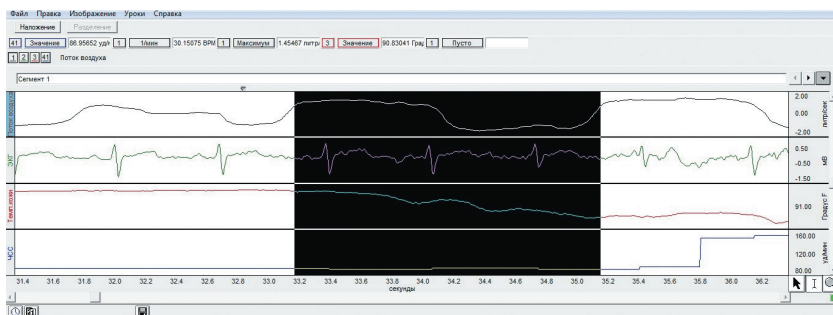


Рис. 5. Окно регистрации данных

Используя I-образный курсор, выберите точку в 10-секундном интервале перед упражнениями и запишите значения ЧСС и температуры тела.

Используя I-образный курсор, выделите участок от начала одного вдоха до начала следующего вдоха и запишите величины частоты дыхания (1/мин) и максимального потока воздуха.

Повторите измерения для сегментов данных «Во время упражнений» и «После упражнений».

13. Заполните в тетради табл. 1–3. Завершите занятие, выключите основной блок и компьютер.

Таблица 1

Данные, полученные во время записи сегмента «До упражнений»

ЧСС [CH41] Зна- чение	Частота дыхания [CH1] 1/мин	Поток воздуха [CH1] Максимум	Температура кожи [CH3] Значение

Таблица 2

**Данные, полученные во время записи сегмента
«Во время упражнений»**

Время (мин)	Время (интер- вал, с)	ЧСС [CH41] Значение	Частота дыхания [CH1] 1/мин	Поток воздуха [CH1] Максимум	Температура кожи [CH3] Значение
1	0–30				
	30–60				
2	60–90				
	90–120				
3	120–150				
	150–180				
4	180–210				
	210–240				
5	240–270				
	270–300				

Таблица 3

**Данные, полученные во время записи сегмента «После
упражнений»**

Время (мин)	Время (интервал, с)	ЧСС [CH41] Значение	Частота дыхания [CH1] 1/мин	Поток воздуха [CH1] Максимум	Температура кожи [CH3] Значение
1	0–30				
	30–60				
2	60–90				
	90–120				
3	120–150				
	150–180				
4	180–210				
	210–240				
5	240–270				
	270–300				

Сделайте выводы и ответьте на вопросы:

1. Раскройте физиологические механизмы изменения параметров частоты сердечных сокращений, частоты дыхания, потока воздуха и температуры кожи.

2. Опишите изменения исследуемых параметров во время упражнений и в течение восстановительного периода. Какие изменения в метаболизме и теплообмене при этом происходят?

Лабораторная работа 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНОГО ОБМЕНА. ДЫХАТЕЛЬНЫЙ КОЭФФИЦИЕНТ

*(работа выполняется на учебном комплексе
«Biopac Student Lab»)*

Все процессы, происходящие в организме, можно разбить на три группы: пластические, энергетические, информационные. Использование химической энергии в организме называют **энергетическим обменом**. В процессе обмена веществ постоянно происходит превращение энергии: потенциальная энергия сложных органических соединений, поступивших с пищей, превращается в тепловую, механическую и электрическую. За счет освобождающейся в организме энергии поддерживается определенная постоянная температура тела и совершается внешняя работа. Наиболее емким потреблением энергии в организме можно считать процесс движения, а также сердечную деятельность, дыхание, перистальтику кишечника и др. За счет окислительных процессов в сердечной мышце освобождается энергия, которая используется для сокращения миокарда и передается крови, что позволяет ей двигаться по сосудам.

Каждая живая клетка нашего организма нуждается в поступлении определенного количества энергии, которая необходима для поддержания нормальной структуры, уровня функциональной готовности и активности (100 % АТФ), а также для выполнения специфических функций. Часть заключенной в питательных веществах химической энергии преобразуется в другие биологически полезные формы — электрическую, осмотическую, механическую. *Основная часть энергии выделяется в виде тепла.*

В основе процессов обмена энергии лежат законы термодинамики — взаимных превращений различных видов энергии при переходах ее от одних тел к другим в форме теплоты или работы. С точки зрения термодинамики живые организмы относятся к *открытым стационарным неравновесным системам*:

1) они обмениваются с окружающей средой веществом и энергией;

2) способны в течение определенного времени удерживать свои основные параметры, но вместе с тем под влиянием внешней среды переходить из одного стационарного состояния в другое в пределах колебаний жизненно важных констант, допустимых для сохранения жизни;

3) благодаря наличию в организме множества градиентов (диффузионные, температурные) и потенциалов (химические, электрические) и возникающих вследствие их действия потоков (диффузионные, тепловые, метаболические, энергетические) создаются условия для неравновесного распределения вещества и энергии между живыми системами и окружающей средой.

Первичная и вторичная теплота

Теплообразование в организме имеет двухфазный характер. При окислении белков, жиров, углеводов одна часть используется для синтеза АТФ, другая превращается в теплоту — это первичная теплота.

Первичная теплота постоянно высвобождается в ходе клеточного метаболизма при окислении веществ вне зависимости от того, совершается внешняя работа или нет. Ее количество является показателем интенсивности основного обмена, обеспечивающего клеточный метаболизм и функционирование жизненно важных органов. В нормальных условиях клетки получают энергию главным образом путем окислительного (аэробного) распада питательных веществ.

При распаде АТФ тоже выделяется теплота — это вторичная теплота. Вторичная теплота выделяется при совершении организмом любой работы за счет резерва аккумулированной энергии АТФ, образующегося в результате метаболических превращений питательных веществ.

В физиологических условиях оба вида теплоты находятся в относительном равновесии. Первичная теплота непрерывно рассеивается в окружающую среду, даже если температура последней превышает температуру тела. Это возможно благодаря механизмам саморегуляции, в частности, потоотделению и испарению, предотвращающим перегревание организма.

При переохлаждении оптимальное для метаболизма количество первичной теплоты обеспечивается за счет увеличения доли вторичной теплоты вследствие усиления двигательной активности и особенно при появлении непроизвольной дрожи (дрожательный термогенез).

Энергетические затраты учитывают по количеству тепла, выделяемого организмом в единицу времени. Единицей измерения энергии в Международной системе единиц (СИ) является д ж о у л ь (Дж) или к и л о д ж о у л ь (кДж).

В физиологических и медицинских исследованиях для определения количества энергии, выделенной организмом, используют внесистемные единицы — к а л о р и ю (кал) или к и л о к а л о р и ю (ккал): $1 \text{ кал} = 4,19 \text{ кДж}$.

Калория — количество энергии (тепла), необходимое для повышения температуры 1 г воды на 1°C .

Сложные органические молекулы, окисляясь в присутствии кислорода (аэробное окисление) до двуокиси углерода и воды, выделяют заключенную в их химических связях энергию. Согласно закону Гесса, количество энергии, выделяемое при распаде какого-либо вещества до конечных продуктов, не зависит от числа промежуточных этапов его трансформации. Следовательно, не имеет значения, окисляется ли вещество полностью в организме или сгорает в специальной камере в присутствии чистого кислорода, — 1 моль вещества дает одинаковое количество энергии.

Для осуществления такого распада в клетке должно поддерживаться определенное содержание субстратов (углеводов, белков, жиров) и молекулярного кислорода. Обмен жиров и углеводов служит главным образом для энергетического обеспечения физиологических функций — ф у н к ц и о н а л ь н ы й м е т а б о л и з м. Белковый обмен направлен на поддержание и реконструкцию структур организма — с т р у к т у р н ы й м е т а б о л и з м.

Энергия, затрачиваемая в покое, быстро переходит в теплоту, поэтому общая теплопродукция эквивалентна затрачиваемой энергии. Измерив теплопродукцию, можно определить интенсивность обмена.

Основной обмен

Даже в условиях полного покоя животные и человек расходуют некоторое количество энергии. В организме непрерывно тратится энергия на физиологические процессы, которые не останавливаются ни на минуту.

Основной обмен — минимальное количество энергии, необходимое для обеспечения нормальной жизнедеятельности в условиях относительного физического и психического покоя. Эта энергия расходуется на процессы клеточного метаболизма, кровообращение, дыхание, выделение, поддержание температуры тела, функционирование жизненно важных нервных центров мозга, постоянную секрецию эндокринных желез.

Любая работа — физическая или умственная, а также прием пищи, колебания температуры окружающей среды и другие внешние и внутренние факторы, изменяющие уровень обменных процессов, влекут за собой увеличение энергозатрат. Для того, чтобы соответствующие измерения интенсивности основного обмена были сопоставимы, установлены специальные условия, которые соблюдают при определении основного обмена. Основной обмен определяют в строго контролируемых, искусственно создаваемых условиях: утром, натощак (через 12–14 часов после последнего приема пищи), в положении лежа на спине, при полном расслаблении мышц, в состоянии спокойного бодрствования, в условиях температурного комфорта (18–20 °C). За 3 суток до исследования из рациона исключают белковую пищу.

Существуют четыре стандартных условия изменения основного обмена — те факторы, которые могут влиять на интенсивность обмена веществ у человека. Рассмотрим эти факторы:

1. Интенсивность процессов обмена подвергается суточным колебаниям. Она возрастает утром и снижается в ночной период.
2. В условиях физической и умственной нагрузки интенсивность обменных процессов возрастает. Это связано с увеличением числа мышечных клеток, участвующих в работе. При умственной работе происходит рефлекторное увеличение мышечного тонуса.
3. Потребление питательных веществ. Связано со специфическим динамическим действием пищи.

4. Температура «комфорта» (18–20 °С), не вызывающая ощущения холода и жара.

Величину основного обмена обычно выражают количеством тепла в кДж (ккал) на 1 кг массы тела или на 1 м² поверхности тела за 1 час.

Основной обмен зависит от возраста, роста, массы тела, пола человека. Самый интенсивный основной обмен в расчете на 1 кг массы тела отмечается у детей. Средние величины основного обмена у взрослых здоровых мужчин составляют 1 300–1 600 ккал/сут или 7 117 кДж в сутки; у женщин эти величины на 10 % ниже. Это связано с тем, что у женщин меньше масса и поверхность тела. С возрастом величина основного обмена неуклонно снижается. Средняя величина основного обмена у здорового человека равна приблизительно 1 ккал/(кг · ч).

Закон поверхности тела Рубнера: зависимость интенсивности основного обмена от площади поверхности тела была показана немецким физиологом Рубнером для различных животных. Согласно этому правилу, интенсивность основного обмена тесно связана с размерами поверхности тела: у теплокровных организмов, имеющих разные размеры тела, с 1 м² поверхности рассеивается одинаковое количество тепла. Таким образом, закон поверхности тела гласит: *энергетические затраты теплокровного организма пропорциональны площади поверхности тела.*

Расход энергии при физической нагрузке

Общий расход энергии человеком зависит от состояния организма и мышечной деятельности. Мышечная работа сопряжена со значительными затратами энергии, с одной стороны, и увеличением теплопродукции — с другой. Из всего количества энергии, расходуемой работающими мышцами, 43 % затрачивается на активацию сокращения, и вся эта энергия переходит в тепло. Только 57 % из общего количества энергии идет на рабочее сокращение.

Разность между энергозатратами при физической нагрузке и энергозатратами основного обмена составляет *рабочую прибавку*, которая тем больше, чем интенсивнее работа. Рабочая

прибавка — это вся остальная энергия, которую тратит организм в течение суток на физическую и умственную активность.

Сумма основного обмена и рабочей прибавки составляет **валовой обмен**. Сумма валового обмена и специфического динамического действия пищи называется **общим обменом**.

Определение энергозатрат организма

Согласно закону Гесса, как уже упоминалось, вся энергия, выделяемая при распаде питательных веществ до конечных продуктов, или тепловой эффект химических реакций, зависит только от состояния исходного вещества и конечных продуктов и не зависит от того, через какие промежуточные стадии или пути обмена идет их распад. Когда физическая работа не совершается, вся химическая энергия переходит в тепло. Это дает возможность использовать теплопродукцию в качестве показателя интенсивности энергетического обмена.

Количество тепла, выделяемого или поглощаемого в ходе различных физических и химических процессов, рассчитывают методами прямой и непрямой калориметрии. В физиологии и медицине калориметрия используется для изучения тепловых эффектов, сопровождающих процессы обмена веществ и энергии в покое, при различных видах деятельности и при заболеваниях.

Методы определения основного обмена

Существует ряд методов для определения основного обмена.

1. *Косвенные методы.* Специальные таблицы и формулы дают возможность по росту, возрасту и массе тела определить средний уровень основного обмена человека. При сопоставлении этих величин с результатами, полученными при исследовании рабочего обмена с помощью приборов, можно вычислить разницу, эквивалентную затратам энергии для выполнения работы.

2. *Прямая калориметрия.* Основана на непосредственном и полном учете количества выделенного организмом тепла. Измерения проводят в специальных камерах — биокалориметрах, хорошо герметизированных и теплоизолированных от окружающей среды. В современных биокалориметрах тепло, выделяемое человеком,

нагревает воду в трубах, фиксированных к потолку камеры. Для расчета количества выделенного тепла учитывают теплоемкость жидкости, общий ее объем, протекающий через камеру за единицу времени, разность температур поступающей в камеру и оттекающей от нее воды.

Современные биокалориметры градиентного типа представляют собой костюмы, тесно облегающие тело человека, но позволяющие ему свободно передвигаться. Это скафандры и термокостюмы, применяемые при исследованиях в космосе, под водой, при работах в аварийных условиях, где необходимо точное измерение тепловыделения организмом. Костюмы снабжены термочувствительными датчиками, один из которых плотно прилегает к телу, а другой контактирует с внешней средой.

3. *Непрямая калориметрия.* Метод основан на определении *газометрических показателей* обмена — количества потребленного кислорода и выделенного углекислого газа за определенный отрезок времени (полный газовый анализ) или в условиях относительного покоя — только количества поглощенного кислорода (неполный газовый анализ) с последующим расчетом теплопродукции.

Полный газовый анализ

При окислении питательных веществ поглощается кислород, выделяется углекислый газ и определенное количество тепла. Количество кислорода, необходимое для окисления 1 г белков, жиров и углеводов, неодинаково, так же как и количество выделяемого углекислого газа и тепла. Первоначально газообмен у человека и животных определяли методом Крога в специальных камерах закрытого типа. В них непрерывно циркулировал воздух, постоянный состав которого поддерживался благодаря удалению двуокиси углерода и подаче кислорода. Необходимые газометрические показатели (объем поглощенного кислорода и выделенной двуокиси углерода) определялись с высокой степенью точности, но недостатки метода (искусственно создаваемая дыхательная смесь, ограничение движения) доминировали над его преимуществами. В настоящее время полный газовый анализ проводят *открытым респираторным методом Дугласа — Холдейна*. Метод основан на сборе выдыхаемого воздуха в специальный приемник (воздухонепроницаемый мешок)

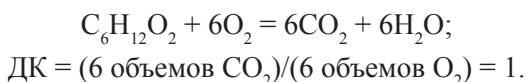
с последующим определением общего его количества и содержания в нем кислорода и двуокиси углерода при помощи газоанализаторов. Зная содержание газов в атмосферном воздухе, можно вычислить, насколько уменьшилось содержание кислорода и насколько увеличилось содержание двуокиси углерода в выдыхаемом воздухе, а затем на основании этих данных определить дыхательный коэффициент.

Дыхательный коэффициент (ДК) — отношение объема выделенной двуокиси углерода к объему поглощенного кислорода:

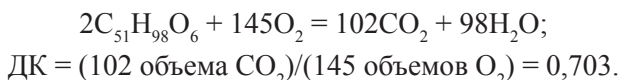
$$\text{ДК} = \text{CO}_2 (\text{л}) / \text{O}_2 (\text{л}).$$

Дыхательный коэффициент характеризует тип питательных веществ, преимущественно окисляемых в организме на момент его определения. Его рассчитывают, исходя из формул химических окислительных реакций.

Для углеводов:



Для жиров:



Для белков расчет представляет определенную трудность, так как белки в организме окисляются не полностью. Некоторое количество азота в составе мочевины $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ выводится из организма с мочой, потом и фекалиями. Поэтому для расчета ДК при окислении белка следует знать количество белка, поступившего с пищей, и количество экскретированных азотсодержащих «шлаков». Установлено, что для окисления углерода и водорода при катаболизме белка и образования 77,5 объема двуокиси углерода необходимо 96,7 объема кислорода. Следовательно, для белков:

$$\text{ДК} = (77,5 \text{ объема } \text{CO}_2) / (96,7 \text{ объема } \text{O}_2) = 0,80.$$

При смешанной пище дыхательный коэффициент составляет 0,8–0,9.

Неполный газовый анализ

Основан на определении расхода энергии по количеству кислорода, потребленного в единицу времени. Для этой цели используют приборы *спирометаболографы*, представляющие замкнутую систему кругооборота газовой смеси, — такие респираторные системы называются закрытыми.

В соответствии с ритмом дыхания регистрируется кривая дыхательных движений — *спирограмма*. Высота наклона кривой соответствует количеству поглощенного кислорода. Объем системы прибора в процессе вдыхания из него кислорода уменьшается эквивалентно объему поглощенного испытуемым кислорода. Испытуемый вдыхает кислород из газометра через трубку с мундштуком и клапаном, CO_2 поглощается натронной известью и удаляется из выдыхаемого воздуха до возвращения в газометр. Нос испытуемого зажат специальным зажимом. Время заполнения камеры строго регистрируется.

Зная объем поглощенного за 1 мин кислорода (V_{O_2}), дыхательный коэффициент (ДК) и соответствующий ему *калорический эквивалент кислорода* (КЭК), можно рассчитать энергообмен за любой промежуток времени (t , мин) по формуле

$$Q_{\text{практ}} = V_{\text{O}_2} \cdot \text{КЭК} \cdot t.$$

Определенному дыхательному коэффициенту соответствует определенный калорический эквивалент кислорода, т. е. количество тепла, которое освобождается при полном окислении 1 г питательного вещества (до конечных продуктов) в присутствии 1 л кислорода (см. табл. 4).

Дыхательный коэффициент при мышечной работе. Главным источником энергии при интенсивной мышечной работе являются углеводы. Поэтому *во время работы* ДК приближается к единице. Сразу *по окончании работы* ДК может резко повыситься. Это явление отражает компенсаторные процессы, направленные на удаление из организма избытка двуокиси углерода, источником которого являются так называемые нелетучие кислоты. Последние, особенно молочная кислота, активно продуцируются работающими мышцами. Эти кислоты связываются с буферными системами плазмы и вытесняют из гидрокарбонат-иона углекислый газ. Таким образом,

общее количество выделяемой двуокиси углерода на короткое время превышает обычное. Через некоторое время по завершении работы ДК может резко снизиться по сравнению с нормой. Это связано с уменьшением выделения двуокиси углерода легкими вследствие компенсаторной задержки его буферными системами крови, предотвращающими сдвиг рН в основную сторону. Примерно через час после завершения работы ДК становится нормальным.

Таблица 4

**Величина калорического эквивалента кислорода
при различных значениях дыхательного коэффициента**

Дыхательный коэффициент	Калорический эквивалент кислорода	Дыхательный коэффициент	Калорический эквивалент кислорода
0,70	4,686	0,86	4,875
0,71	4,690	0,87	4,887
0,72	4,702	0,88	4,900
0,73	4,714	0,89	4,912
0,74	4,727	0,90	4,924
0,75	4,739	0,91	4,936
0,76	4,752	0,92	4,948
0,77	4,764	0,93	4,960
0,78	4,776	0,94	4,973
0,79	4,789	0,95	4,985
0,80	4,801	0,96	4,997
0,81	4,813	0,97	5,010
0,82	4,825	0,98	5,022
0,83	4,838	0,99	5,034
0,84	4,850	1,00	5,047
0,85	4,863	—	—

Цель работы: рассчитать дыхательный коэффициент и суточный основной обмен с помощью измерений в газоанализаторе и расчетным путем.

Оборудование и материалы

Компьютер; программное обеспечение «Biopac Student Lab»; основной блок системы BIOPAC (MP36 с кабелями и блоком питания); камера газоанализатора (GasSys2-EA); датчик потока воздуха со сменным стерилизуемым наконечником (SS11LA); большой шприц для калибровки (AFT6); Т-образный переходник для системы газоанализатора; гибкий шланг для системы газоанализатора (AFT7); зажимы для Т-образного переходника (AFT11C) и гибкого шланга (AFT11E); одноразовый загубник и два бактериальных фильтра; зажим для носа; спиртосодержащий препарат и одноразовые салфетки.

Ход работы

1. Выберите испытуемого и вычислите теоретический суточный основной обмен ($Q_{\text{теор}}$).

Определите вес и рост испытуемого, рассчитайте площадь поверхности тела, используя формулу

$$S = 1 + (M + H - 1)/100,$$

где S — площадь поверхности тела (м^2); M — масса тела (кг); H — рост (см).

С помощью табл. 5 определите удельный основной обмен (e), измеряемый в $\text{ккал}/(\text{ч} \cdot \text{м}^2)$.

Таблица 5

Данные по удельному основному обмену

Возраст (лет)	Мужчины	Женщины
1	53	53
2	52	52
5	49	48
8	46	44
10	44	42
12	43	41

Возраст (лет)	Мужчины	Женщины
15	42	38
20	39	36
25	38	35
30	37	35
40	36	35
50	36	34
60	35	33
70	34	32
80 и старше	33	31

Определите величину теоретического суточного основного обмена, подставляя известные значения в формулу

$$Q_{\text{теор}} = 24 \cdot e \cdot S.$$

2. Проверьте подключение оборудования к основному блоку. Датчик потока воздуха должен быть подключен к каналу 1 (CH1), провод от датчика кислорода в системе газоанализатора — к каналу 2 (CH2), провод от датчика углекислого газа — к каналу 3 (CH3).

3. Проверьте сборку для калибровки: гибкий шланг от газоанализатора через синий зажим должен быть присоединен к Т-образному переходнику, затем последовательно подключается датчик потока воздуха и бактериальный фильтр (со стороны метки «Inlet»). Свободный конец Т-образного переходника через прозрачный зажим соединяется со шприцом для калибровки.

4. Включите компьютер, основной блок и систему газоанализатора.

5. На рабочем столе компьютера запустите программу «BSL PRO». Через меню программы откройте файл «h19.gtl» — это и есть файл текущего урока.

6. Проведите процедуру *калибровки*. Так как процедура длительная, отнеситесь со всем вниманием к настройке газоанализатора для получения корректных данных.

С помощью шприца для калибровки заполните камеру газоанализатора окружающим воздухом. Необходимо прокачивать камеру

в течение 7–10 минут перед каждым новым измерением. После заполнения камеры окружающим воздухом поршень шприца должен быть в отжатом положении.

Запустите меню настройки каналов («MP30 (36) → Setup Channels (Настройка каналов)», см. рис. 6).

Канал	Отображать кривую	Отображать значения	Название	Профили	Параметры
АНАЛОГОВЫЕ ВХОДНЫЕ КАНАЛЫ					
CH1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Fi (inspired)	▼	↕
CH2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	O2E (expired)	▼	↕
CH3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	CO2E (expired)	▼	↕
CH4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	CH4 Input	▼	↕
ЦИФРОВЫЕ ВХОДНЫЕ КАНАЛЫ					
D1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	D1 - Цифровой вход		
D2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	D2 - Цифровой вход		
D3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	D3 - Цифровой вход		
D4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	D4 - Цифровой вход		
ВЫЧИСЛЯЕМЫЕ КАНАЛЫ					
C4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	VES (STPD; expired)	▼	↕
C5	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	VO2	▼	↕
C6	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	VCO2	▼	↕
C7	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	RER	▼	↕

Рис. 6. Окно настройки каналов

Калибровка канала потока воздуха

В меню настройки каналов (см. рис. 6) нажмите на знак гаечного ключа для CH1. В открывшемся окне нажмите на кнопку «Scaling (Измерение)». В появившемся меню нажмите на кнопку «Call». Вычитите 3 000 из значения в окне «Call» и полученное число введите

в окно Cal2. В окнах «Scale Value» для Cal1 и Cal2 введите значения «0» и «10» соответственно. Нажмите кнопку «ОК».

Калибровка канала для измерения O_2

В меню настройки каналов нажмите на знак гаечного ключа для CH2. В открывшемся окне нажмите на кнопку «Scaling (Измерение)». В появившемся меню нажмите на кнопку «Cal2». Введите число «20.93» в окно «Scale Value» для Cal2. В окне для Cal1 введите значение «0», в окно «Scale Value» для Cal1 также введите значение «0». Нажмите кнопку «ОК».

Калибровка канала для измерения CO_2

В меню настройки каналов нажмите на знак гаечного ключа для CH3. В открывшемся окне нажмите на кнопку «Scaling (Измерение)». В появившемся меню нажмите на кнопку «Cal1». Введите число «0.04» в окно «Scale Value» для Cal1. Прибавьте 10 к значению в окне «Cal1» и полученное число введите в окно «Cal2». В окне «Scale Value» для Cal2 введите значение «1». Нажмите кнопку «ОК».

Коэффициент нормализации для влажной газовой смеси

Измерьте температуру в аудитории и атмосферное давление. В разделе «Профессиональные уроки (BSL PRO)» на компьютере откройте урок H19 « VO_2 and RER Measurement». С помощью специальной таблицы в конце урока H19 найдите коэффициент нормализации для влажной газовой смеси, используя значения текущей температуры и атмосферного давления. В меню настройки каналов в разделе «Вычисляемые каналы» нажмите на знак гаечного ключа для C3 Vis (STPD). В открывшемся окне введите полученный коэффициент нормализации в формулу. Нажмите кнопку «ОК».

Настройка вычисляемых каналов

Для вычисляемых каналов (см. рис. 6) C5, C6 и C7 измените заголовки на « VO_2 », « VCO_2 » и «RER» (Respiratory Exchange Ratio) соответственно. Для каналов C5 и C7 поставьте значки во все три окна («Принимать данные», «Отображать кривую», «Отображать значения»). Для канала C6 поставьте значок только в одно окно — «Принимать данные».

7. Отсоедините калибровочный шприц от Т-образного переходника. Через прозрачный зажим присоедините к Т-образному переходнику второй бактериальный фильтр и загубник.

8. Приготовьтесь к записи. Необходимо записать три сегмента:

- *нормальное состояние*. В файле текущего урока нажмите кнопку «Start». Испытуемый должен нормально дышать не менее двух минут. После этого регистратор нажимает кнопку «Stop»;

- *восстановительный период после упражнений*. Перед записью сегмента испытуемый в течение нескольких минут выполняет упражнения средней нагрузки. После окончания упражнений как можно быстрее начните процедуру записи. Нажмите кнопку «Start» и две минуты проводите запись, затем нажмите «Stop»;

- *гипервентиляция*. Испытуемый одну минуту дышит нормально. Затем регистратор дает команду, ставит метку (нажимает кнопку F9), а испытуемый в течение одной минуты глубоко и быстро дышит (состояние гипервентиляции). Как только время гипервентиляции заканчивается, регистратор вновь дает команду испытуемому для возврата к нормальному дыханию и ставит метку. Испытуемый в течение еще одной минуты продолжает дышать нормально. После этого регистратор нажимает на кнопку «Stop».

Данные должны соответствовать рис. 7.

9. Переходите к анализу полученных результатов.

Настройте окно данных для оптимального отображения полученных данных. Установите каналы вычислений:

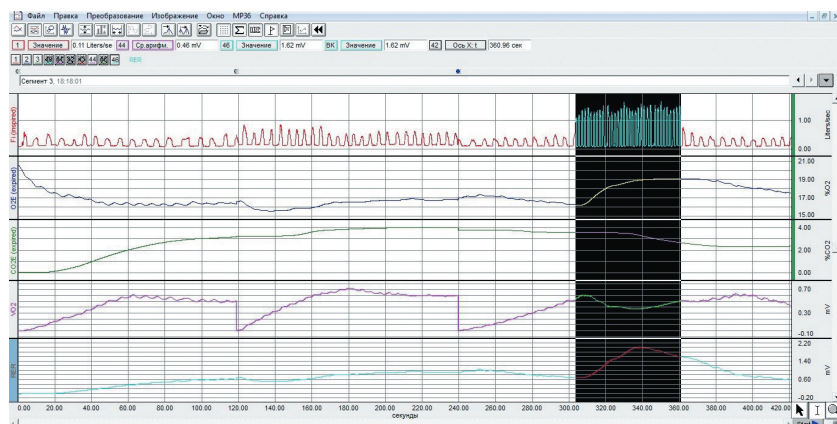


Рис. 7. Окно регистрации данных

— СН1 («Значение») — отображает величину амплитуды для канала в момент, выделенный I-образным курсором. Если выбрана единственная точка, то величина соответствует ей, если же выделен участок — то амплитуде в его конечной точке;

— СН44 («Ср. арифм.») — отражает среднее значение на выделенном участке;

— СН46 («Значение»).

В каждом из трех сегментов, используя I-образный курсор, выделите минутный интервал (см. рис. 7). Запишите значения для объема потребленного кислорода за 1 минуту (V_{O_2}) и для дыхательного коэффициента (ДК или RER) для каждого из трех сегментов.

10. Заполните в тетради табл. 6. Завершите занятие, выключите основной блок, систему газоанализатора и компьютер.

Таблица 6

Результаты измерений по основному обмену

Сегмент	V_{O_2} (л/мин)	Дыхательный коэффициент
Нормальное состояние		
Восстановительный период после упражнений		
Гипервентиляция		

11. По формуле определите основной обмен за 24 часа ($Q_{\text{практ}}$).

Сделайте выводы и ответьте на вопросы:

1. Опишите изменения дыхательного коэффициента при восстановлении после упражнений и гипервентиляции. Какие физиологические и биохимические изменения лежат в основе этих изменений?

2. Какие метаболиты преимущественно окисляются в организме испытуемого на момент измерения дыхательного коэффициента?

3. Сравните величины теоретического и практического основных обменов у испытуемого. Есть ли различия в показателях и чем можно их объяснить?

ТЕМА 2. АТОМНАЯ ФИЗИКА И КВАНТОВАЯ МЕХАНИКА В ПРИМЕНЕНИИ К БИОЛОГИЧЕСКИМ СИСТЕМАМ

Лабораторная работа 3

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

При пропускании света через слой вещества его интенсивность уменьшается (рис. 8). Уменьшение интенсивности является следствием взаимодействия световой волны с электронами вещества, в результате которого часть световой энергии передается электронам. Это явление называется *поглощением света*. Молекулы, имеющие одинаковую связь и образующие одну группу, выдают полосы поглощения соответствующей *характеристической частоты*. По данным характеристическим частотам (по получаемому спектру) можно определять имеющиеся в исследуемой взвеси искомые группы атомов или молекул. Спектрофотометрию делят на *молекулярную*, когда искомое вещество — молекулярная структура, и *атомную*.

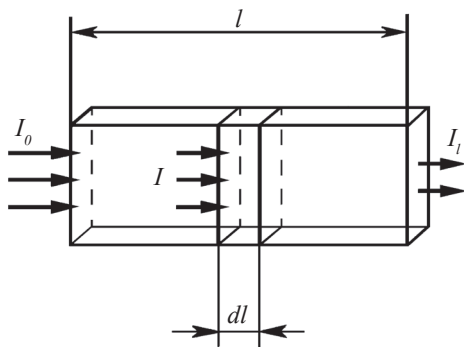


Рис. 8. Изменение интенсивности света при прохождении через слой вещества [Блохина, Эссаулова, Мансурова, с. 237]

Фотометрический анализ спектров поглощения основан на измерении *интенсивности полос поглощения*, которая определяется числом переходов в единицу времени молекул поглощающего вещества из основного энергетического состояния в данное возбужденное. Измерение интенсивности сводится к определению доли энергии падающего излучения, поглощенной веществом. Спектрофотометрический анализ проводится на основе закона Бугера — Ламберта — Бера:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon Cl},$$

где I — интенсивность света, прошедшего слой вещества l , если интенсивность входящего в среду света I_0 ; C — концентрация раствора, в молях на литр; ε — молярный показатель поглощения.

Оптическая плотность вещества D равна:

$$D = \varepsilon Cl.$$

Молярный показатель поглощения ε численно равен оптической плотности раствора с молярной концентрацией 1 моль/л и толщиной 1 см.

Количественное определение вещества по спектрам поглощения можно проводить в том случае, если исследуемый образец удовлетворяет требованиям закона Бугера — Ламберта — Бера: *поглощающие молекулы распределены по всему объему образца равномерно; поглощающие молекулы в пределах исследуемых концентраций не изменяют характера взаимодействия друг с другом и с молекулами среды; при прохождении образца световой поток ослабляется только за счет поглощения фотонов; измеряемый световой поток не вызывает фотохимических изменений поглощающих молекул.*

По спектрам поглощения, полученным с помощью спектрофотометра, можно определять концентрацию веществ, содержащихся в смесях. Если компоненты смеси не взаимодействуют между собой, то оптическая плотность D смеси равна сумме оптических плотностей D_1 и D_2 компонентов. Для двухкомпонентной смеси

$$D = D_1 + D_2 = \varepsilon_1 C_1 l_1 + \varepsilon_2 C_2 l_2.$$

Измеряя D при двух длинах волн λ_1 и λ_2 , получаем:

$$D' = \varepsilon'_1 C_1 l_1 + \varepsilon'_2 C_2 l_2;$$

$$D'' = \varepsilon''_1 C_1 l_1 + \varepsilon''_2 C_2 l_2$$

(индексы «1» и «2» относятся к разным веществам, индексы «'» и «''» — к длинам волн λ_1 и λ_2) (рис. 9).

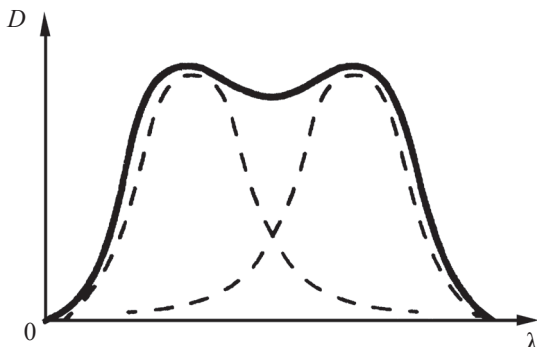


Рис. 9. График зависимости $D = f(\lambda)$. Пунктирной линией изображены графики зависимости $D_1 = f(\lambda)$ и $D_2 = f(\lambda)$ для компонентов смеси [Блохина, Эссаулова, Мансурова, с. 243]

Зная молярные показатели поглощения компонентов $\varepsilon'_1, \varepsilon'_2$ и $\varepsilon''_1, \varepsilon''_2$ при этих длинах волн, можно из системы уравнений определить молярные концентрации C_1 и C_2 этих веществ:

$$C_1 = (D'\varepsilon''_2 - D''\varepsilon'_2) / (\varepsilon'_1\varepsilon''_2 - \varepsilon''_1\varepsilon'_2);$$

$$C_2 = (D'\varepsilon''_1 - D''\varepsilon'_1) / (\varepsilon'_1\varepsilon''_2 - \varepsilon''_1\varepsilon'_2).$$

Спектрофотометрию широко применяют в биологии и медицине для проведения качественного и количественного анализа различных соединений, а также для изучения физико-химического состояния биомолекул. Применение этого метода позволяет, не нарушая целостности клеток и тканей, наблюдать за ходом химических процессов в них, а также судить о строении молекул и состоянии биологических структур.

Цель работы: изучение принципа действия спектрофотометра, исследование зависимости оптической плотности растворов от концентрации и проведение количественного спектрофотометрического анализа смеси веществ.

Оборудование и материалы

Спектрофотометр, растворы исследуемых веществ различных концентраций.

Описание экспериментальной установки

Двухлучевой регистрирующий спектрофотометр предназначен для измерения оптических плотностей различных образцов в видимой части спектра (рис. 10).

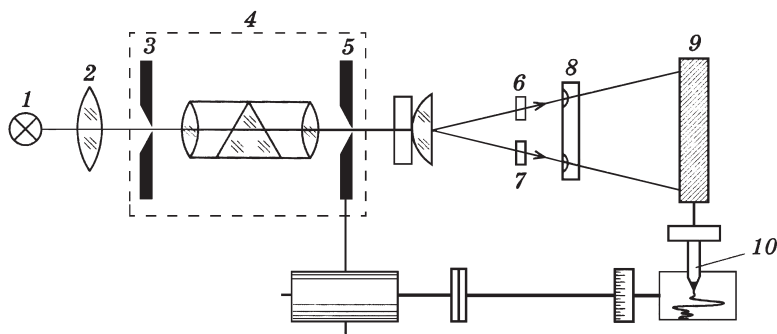


Рис. 10. Упрощенная схема двухлучевого регистрирующего спектрофотометра [Блохина, Эссаулова, Мансурова, с. 244] (пояснения в тексте)

Свет от источника 1 со сплошным спектром излучения собирается с помощью конденсора 2 на входную щель 3 монохроматора 4, разлагающего свет от источника в спектр. Выходная щель монохроматора 5 подвижна, и ее положение однозначно связано с делениями барабана длин волн. После монохроматора луч разделяется на два пучка, один из которых проходит через кювету с исследуемым раствором 6, а другой — через кювету с растворителем 7. После прохождения кювет пучки света с помощью прерывателя 8 поочередно направляются на фотоэлемент 9. Выходной сигнал фотоэлемента усиливается и преобразуется в перемещение писчика 10 самописца. Самописец регистрирует логарифм отношения интенсивностей двух лучей — оптическую плотность D .

Для исследования можно использовать растворы гемоглобина, цитохрома С или наборы красителей для люминесцентной микроскопии. Желательно применять вещества, у которых спектры поглощения частично перекрываются. При приготовлении растворов необходимо учитывать, что наибольшая точность определения концентрации получается при оптических плотностях 0,2–0,8.

Ход работы

1. Исследование зависимости оптической плотности вещества от концентрации.

1. Получите на спектрофотометре графики зависимости оптической плотности растворов известных концентраций C от длины волны.
2. Определите по графикам оптические плотности D данных растворов при заданной длине волны.
3. Постройте график зависимости $D = f(C)$.
4. Измерьте при той же длине волны оптическую плотность раствора данного вещества неизвестной концентрации и определите по графику его концентрацию.
5. Результаты измерений занесите в табл. 7.

Таблица 7

Результаты измерений

C , моль/л	D

2. Исследование количественного состава смеси веществ.

1. Получите на спектрофотометре графики зависимости оптической плотности от длины волны для растворов двух веществ известной концентрации C_{01} и C_{02} :

$$D_1 = f(\lambda);$$

$$D_2 = f(\lambda).$$

2. Определите по полученным графикам длины волн λ_1 и λ_2 , соответствующие максимумам спектров поглощения.

3. Вычислите молярные показатели поглощения ε'_1 , ε''_1 и ε'_2 , ε''_2 для данных веществ при длинах волн λ_1 и λ_2 :

$$\varepsilon'_1 = D'_1 / C_{01} l;$$

$$\varepsilon''_1 = D''_1 / C_{01} l;$$

$$\varepsilon'_2 = D'_2 / C_{02} l;$$

$$\varepsilon''_2 = D''_2 / C_{02} l.$$

Толщина кювет l указана на установке.

4. Получите на спектрофотометре график зависимости оптической плотности смеси веществ от длины волны $D = f(\lambda)$.

5. Определите по графику оптические плотности D' и D'' смеси при длинах волн λ_1 и λ_2 .

6. Вычислите молярные концентрации C_1 и C_2 веществ в смеси (см. соответствующую формулу в краткой теории).

Сделайте выводы и ответьте на вопросы:

1. В чем состоит метод спектрофотометрии?
2. Опишите устройство и принцип действия спектрофотометра.
3. Для чего применяется спектрофотометрический анализ в медицине и биологии?
4. Запишите закон Бугера — Ламберта — Бера.
5. Изобразите графики зависимости оптической плотности раствора от его концентрации и длины волны света.

Лабораторная работа 4

РЕНТГЕНОВСКАЯ КОМПЬЮТЕРНАЯ ТОМОГРАФИЯ

(работа выполняется на базе департамента
Физический факультет ИЕНиМ УрФУ)

Рентгеновские лучи (X-лучи) — вид электромагнитного излучения, имеющего длину волны от 70 до 10^{-5} нм. Чем короче длина волны X-лучей, тем больше энергия их фотонов и больше проникающая способность.

Тормозное рентгеновское излучение возникает при торможении электронов, движущихся с большой скоростью, электрическими полями атомов анода. Условия торможения отдельных электронов не одинаковы. В результате в энергию рентгеновского излучения переходят различные части их кинетической энергии.

Спектр тормозного рентгеновского излучения не зависит от природы вещества анода. Как известно, энергия фотонов рентгеновских лучей определяет их частоту и длину волны. Поэтому тормозное рентгеновское излучение не является монохроматическим. Оно характеризуется разнообразием длин волн, которое может быть представлено *сплошным (непрерывным) спектром*.

Характеристическое рентгеновское излучение возникает, когда быстрый электрон, достигая анода, проникает во внутренние орбитали атомов и выбивает один из их электронов. В результате появляется свободное место, которое может быть заполнено другим электроном, спускающимся с одной из верхних атомных орбиталей. Такой переход электрона с более высокого на более низкий энергетический уровень вызывает рентгеновское излучение определенной дискретной длины волны. Поэтому характеристическое рентгеновское излучение имеет *линейчатый спектр*. Частота линий характеристического излучения полностью зависит от структуры электронных орбиталей атомов анода. Линии спектра характеристического излучения разных химических элементов имеют одинаковый вид, поскольку структура их внутренних

электронных орбиталей идентична. Частота линий спектра характеристического рентгеновского излучения изменяется в соответствии с атомным номером элемента и определяется уравнением Мозли:

$$\sqrt{\nu} = A(Z - B),$$

где ν — частота спектральной линии; Z — атомный номер химического элемента; A и B — константы.

Поглощение рентгеновского излучения веществом. При прохождении рентгеновских лучей через вещество их энергия уменьшается из-за поглощения и рассеяния. Ослабление интенсивности параллельного пучка рентгеновских лучей, проходящих через вещество, определяется законом Бугера (происходит по экспоненциальному закону):

$$I = I_0 \cdot \exp(-\mu d),$$

где I_0 — начальная интенсивность рентгеновского излучения; I — интенсивность рентгеновских лучей, прошедших через слой вещества; d — толщина поглощающего слоя; μ — линейный коэффициент ослабления.

На практике и в эксперименте используют массовый коэффициент ослабления μ_m , равный отношению линейного коэффициента ослабления к плотности вещества ρ :

$$\mu_m = \mu/\rho$$

или

$$\mu_m = kZ^3\lambda^3,$$

где k — коэффициент прямой пропорциональности; ρ — плотность вещества; Z — атомный номер элемента; λ — длина волны рентгеновских лучей.

Зависимость от Z очень важна с практической точки зрения. Например, коэффициент поглощения костей, которые состоят из фосфата кальция, почти в 150 раз превышает коэффициент поглощения мягких тканей ($Z = 20$ — для кальция и $Z = 15$ — для фосфора). При прохождении рентгеновских лучей через тело человека кости четко выделяются на фоне мышц, соединительной ткани и т. п.

Рентгеновская компьютерная томография (РКТ). Оснащенный вычислительной техникой осевой томографический сканер является наиболее современным аппаратом рентгенодиагностики, который позволяет получить четкое изображение любой части человеческого тела, включая мягкие ткани органов. КТ имеет множество преимуществ по сравнению с более ранними методами рентгенодиагностики. Она характеризуется высоким разрешением, которое дает возможность различать тонкие изменения мягких тканей. КТ позволяет обнаружить такие патологические процессы, которые не могут быть обнаружены другими методами. Кроме того, использование КТ позволяет уменьшить дозу рентгеновского излучения, получаемого в процессе диагностики пациентами. РКТ — метод послойного исследования внутренней структуры объекта с помощью рентгеновского излучения. В отличие от обычных рентгеновских снимков, отражающих проекции перекрывающихся структур, при РКТ формируется изображение дискретных срезов объекта, лежащих на различной глубине (рис. 11).

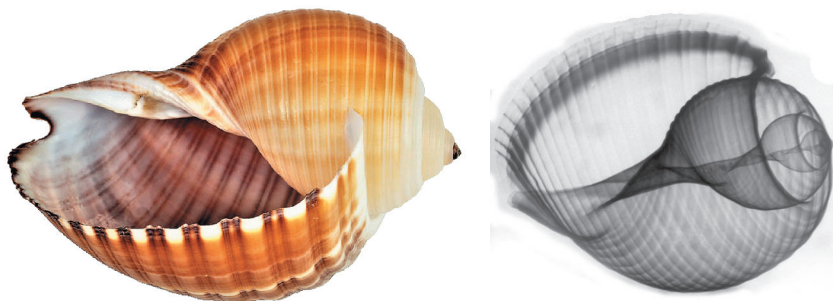


Рис. 11. Рентгенограмма ракушки (трехмерная реконструкция) с томографическим сечением, позволяющим увидеть внутреннее строение

РКТ заключается в измерении пространственного распределения коэффициента ослабления рентгеновских лучей веществом и расчете на основе этих данных послойных изображений, свободных от теневых наложений. Объект исследования может быть представлен в виде совокупности конечного числа слоев определенной толщины.

Каждая томограмма несет информацию о структуре одного слоя, а каждый слой есть совокупность конечного числа объемных элементов. Значения измеряемого коэффициента ослабления, характеризующего эти объемные элементы, присваиваются элементам двумерной матрицы, которая и формирует КТ-изображение (рис. 12).

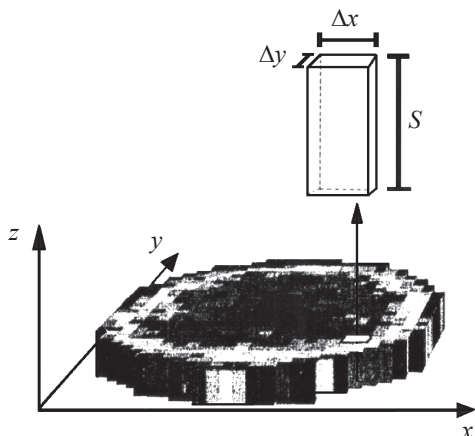


Рис. 12. КТ-метод послойной визуализации объекта:
 S — толщина слоя; Δx , Δy — размеры элемента матрицы КТ-изображения

В самом простом случае, если ослабляющая среда однородна, а рентгеновское излучение монохроматическое, то для определения коэффициента ослабления μ достаточно одного измерения и его значение равно:

$$\mu = \frac{1}{d} \cdot \ln(I_0/I).$$

В действительности ослабляющая среда неоднородна (рис. 13, б). Каждый объемный элемент объекта имеет собственное значение коэффициента ослабления. В результате одного измерения мы можем получить только суммарный коэффициент ослабления рентгеновского излучения всеми объемными элементами, расположенными по ходу пучка рентгеновских лучей:

$$I = I_0 \cdot \exp \cdot (\mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \dots + \mu_n) \cdot d,$$

где d — толщина образца в направлении рентгеновского пучка. Для определения коэффициентов ослабления каждого элемента одного измерения уже недостаточно.

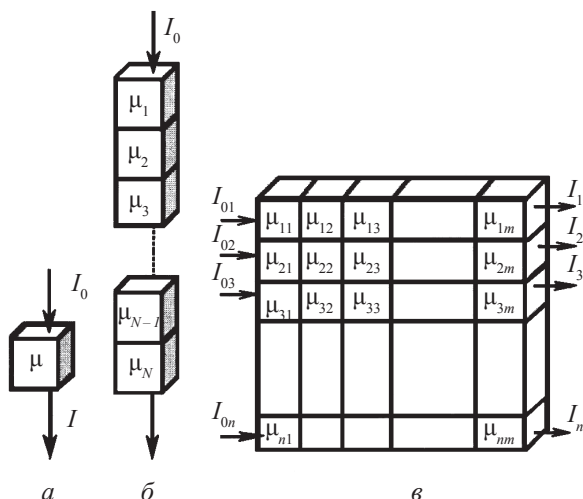


Рис. 13. Определение коэффициента ослабления для однородной (а) и неоднородной (б) среды; в общем случае (в)

В общем случае коэффициент ослабления является функцией трех пространственных координат (x, y, z) от энергии рентгеновских лучей (так как в действительности рентгеновское излучение не монохроматическое), а в некоторых случаях и времени t (для биологических объектов):

$$\mu = \mu(x, y, z, E, t).$$

Очевидно, что для определения пространственного распределения коэффициента ослабления μ одного измерения недостаточно. Требуется провести множество измерений в разных направлениях (рис. 13, в). Данные этих измерений подвергаются сложной вычислительной обработке.

Существует несколько способов расчета томографических изображений, например, используют *алгебраические алгоритмы*. Этот метод заключается в построении системы уравнений, в которой

неизвестными являются искомые значения коэффициентов ослабления. Например, для нахождения коэффициентов ослабления 4-х объемных элементов (рис. 14) требуется решить систему 4-х уравнений с 4-мя неизвестными. Для современных матриц реконструкции, состоящих из 1024×1024 или 512×512 элементов (пикселей), такие алгоритмы слишком громоздки и вместо них применяют *аналитические алгоритмы* расчета, в которых распределение изучаемого параметра описывается непрерывной функцией (модель реконструкции изображений в виде интегрального уравнения).

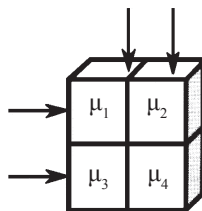


Рис. 14. Алгебраический способ реконструкции томографических изображений

Наряду с пространственным распределением коэффициента ослабления при выполнении РКТ рассчитываются так называемые *КТ-числа*, или числа Хаунсфилда (они измеряются в единицах шкалы Хаунсфилда). Для ткани Т с коэффициентом ослабления μ_t КТ-число определяется следующим образом:

$$\text{КТ-число} = ((\mu_t - \mu_{\text{H}_2\text{O}}) / \mu_{\text{H}_2\text{O}}) \cdot 1\,000 \text{ HU}.$$

Шкала Хаунсфилда имеет две опорные точки. Воде и эквивалентным ей по ослаблению тканям присваивают значение КТ-числа, равное 0 HU. Воздуху присваивают КТ-число — 1 000 HU, так как с хорошим приближением $\mu_{\text{воздуха}} = 0$. Для различных биологических тканей в нормальном состоянии характерны определенные диапазоны КТ-чисел. Отличие от этих значений свидетельствует о наличии патологического процесса.

Интерпретация КТ-числа в большинстве случаев однозначна: более высокие КТ-числа соответствуют тканям с большим значением

плотности, а зависимость КТ-числа от плотности выражается линейной функцией. При этом не учитывается зависимость коэффициента ослабления от структуры самого ослабляющего вещества. Речь идет в первую очередь об атомном номере и химической структуре вещества. Оценка таких зависимостей для биологических объектов не представляется возможной в силу чрезвычайно сложного строения макромолекулярных комплексов, из которых они состоят. Чтобы такими зависимостями можно было пренебречь, в клинической РКТ применяют рентгеновское излучение большой мощности. (Рентгеновские трубки в современных КТ-системах имеют мощность 20–60 кВт при напряжении 80–140 кВ.)

Цель работы: изучить теоретические основы и оценить практические возможности рентгеновской компьютерной томографии (РКТ) как неразрушающего метода исследования внутренней структуры объекта.

Оборудование и материалы

Учебный лабораторный комплекс «Основы рентгеновской компьютерной томографии» (рентгеновский аппарат и блок компьютерной томографии LEYBOLD DIDACIC (Германия)); персональный компьютер; образцы (объекты живой и неживой природы).

Описание экспериментальной установки

Учебная установка для проведения РКТ состоит из трех основных блоков:

- рентгеновского аппарата (РА);
- блока КТ;
- персонального компьютера (ПК) с программой реконструкции томографических изображений.

В рентгеновском аппарате в отдельном отсеке находится источник рентгеновских лучей (РЛ) — рентгеновская трубка (РТ) с вольфрамовым анодом. РТ представляет собой стеклянный баллон, откачанный до 10^{-4} – 10^{-5} Па. Внутри баллона располагаются два электрода: катод и анод. При пропускании тока через катод он раскаляется и эмитирует электроны. Между катодом и анодом поддерживается высокая разность потенциалов, поэтому вылетевшие с катода электроны ускоряются и бомбардируют анод. *При торможении быстрых электронов веществом анода возникают электромагнитные волны с длинами от 10^{-3} до 10 нм, которые называются рентгеновским*

излучением (РИ). Вид спектра РИ определяется величиной ускоряющего напряжения между катодом и анодом РТ. При достижении некоторого критического значения ускоряющего напряжения, называемого потенциалом возбуждения, возникает *характеристический* спектр. При значениях ускоряющего напряжения меньше потенциала возбуждения возникает сплошной (*тормозной*) спектр. В РКТ применяется только тормозное РИ.

Выходное отверстие трубки направлено в экспериментальный отсек (ЭО) рентгеновского аппарата. В ЭО находится гониометр — прибор для управляемого углового перемещения объекта исследования. Объект исследования закрепляется на гониометре с помощью специального держателя на пути рентгеновского пучка (РП). На противоположной стороне ЭО расположен люминесцентный экран, на котором формируется рентгенограмма объекта исследования. Камера в блоке КТ записывает рентгенограммы объекта как функцию угла поворота объекта исследования, закрепленного на гониометре рентгеновской установки. Затем программа реконструкции изображений восстанавливает по записанным рентгенограммам трехмерное томографическое изображение объекта.

Порядок работы с установкой:

1. Включите в сеть РА, блок КТ и загрузите ПК.
2. Запустите программу реконструкции изображений «Computerized Tomography» (ярлык программы находится на рабочем столе ПК).
3. В открывшемся окне программы найдите вкладку «X-Rays» и установите значения управляющих параметров РТ. Управляющими параметрами являются ускоряющее напряжение U и анодный ток I . Эти параметры определяют энергию генерируемого рентгеновского пучка и качество получаемых рентгенограмм объекта. Установите следующие значения управляющих параметров: $U = 35 \text{ кВ}$; $I = 1 \text{ мА}$. Эти значения являются рекомендуемыми, и они соответствуют наилучшему качеству рентгенограмм.
4. На вкладке «Computed Tomography Size» необходимо выбрать количество получаемых при сканировании рентгенограмм объекта «Number of projection», т. е. число его проекций. Выбранное *число проекций не должно быть меньше 180*, иначе качество реконструкции объекта будет низким.
5. Откройте экспериментальный отсек рентгеновского аппарата и закрепите на держателе гониометра объект исследования.
6. Плотно закройте дверки экспериментального отсека. Подача высокого напряжения на рентгеновскую трубку возможна только при закрытых дверцах.
7. Проследите за тем, чтобы крышка блока КТ была плотно закрыта, иначе запись рентгенограмм объекта невозможна (из-за засветки).

8. Запуск процесса сканирования производится с помощью кнопки «Start CT scan» («Начать КТ-сканирование») на панели инструментов в окне программы реконструкции. При ее нажатии происходит подача высокого напряжения на анод рентгеновской трубки и включается камера в блоке КТ. Индикатором работы трубки и камеры служат мигающие красные точки напротив вкладок «X-Rays» и «Camera». Перед началом сканирования следует ввести имя файла и сохранить его в папку <...>. После этого начинается процесс сканирования.

9. Процесс реконструкции объекта можно наблюдать в 2D и 3D режимах. Время сканирования определяется числом получаемых проекций (скорость записи — 1 рентгенограмма в секунду) и отображается в правом верхнем углу окна программы реконструкции.

Внимание! Нельзя останавливать процесс сканирования до истечения указанного времени: реконструкция изображения не может быть осуществлена по неполному числу рентгенограмм. После истечения времени сканирования отключение высокого напряжения РТ и камеры производится автоматически.

10. После завершения процесса сканирования необходимо произвести восстановление изображений по проекциям — трехмерную реконструкцию изображения (иконка «Reconstruction CT image»). После этого реконструкция становится доступна для работы с ней.

Требования техники безопасности

Данная работа выполняется с использованием рентгеновского аппарата малой мощности (35 Вт) с напряжением сети питания 220 В и высоким напряжением на РТ 35 кВ. За счет специально принимаемых мер обеспечиваются безопасные условия эксплуатации установки. В частности, дверцы экспериментального отсека выполнены из освинцованного стекла, поэтому в процессе работы рентгеновской трубки при закрытых дверцах величина ионизирующего излучения (ИИ) не превышает уровня естественного фона.

Необходимо соблюдать следующие правила:

- включать и выключать установку разрешается только в присутствии преподавателя;
- не рекомендуется производить изменения управляющих параметров при работе с программой реконструкции изображений (за исключением тех, которые указаны в настоящем описании работы);
- запрещается оставлять работающую установку без присмотра;
- запрещается употреблять пищу и пить в учебной аудитории.

Работа с томографической реконструкцией

Восстановление по проекциям объекта реконструкции (ОР) позволяет исследовать внутреннюю структуру этого объекта и получать томографические сечения в различных плоскостях. С полученной реконструкцией можно проводить следующие манипуляции:

1. Повороты (левая клавиша мыши).
2. Увеличение/уменьшение (правая клавиша мыши).
3. Выделение интересующих сечений (ползунковый регулятор внизу экрана или колесо компьютерной мыши).
4. Определение размеров внутренних структур (с помощью маркерных линий красного цвета).
5. Определение локальных значений линейного коэффициента ослабления рентгеновских лучей (в 1 см) и КТ-чисел образца (в ед. плотности НУ).

Ползунковый регулятор «Intensity» предназначен для установления верхнего предела отображаемых значений коэффициентов ослабления μ и КТ-чисел. Его сдвиг вправо позволяет различить структуры с близкими значениями коэффициента ослабления и КТ-числа. Регулятор «Transparency» служит для установки нижнего предела значений отображаемых коэффициентов ослабления и КТ-чисел. При его передвижении вправо пропадают структуры с наименьшими показателями μ . Непрерывный цветовой спектр, расположенный под регуляторами, представляет собой цветовую интерпретацию отображаемых значений μ и КТ-чисел. На его левом конце указывается наименьшее отображаемое значение μ и КТ-числа, а на правом — наибольшее.

Ход работы

1. Определите количество и линейные размеры полостей в образце, предложенном преподавателем.

2. Определите зависимость коэффициента ослабления μ (1/см) и КТ-числа (НУ) от плотности раствора карбоната натрия Na_2CO_3 ρ (г/см³). Заполните табл. 8 и постройте на основании ее данных графики соответствующих зависимостей.

3. Определите зависимость коэффициента ослабления μ (1/см) и КТ-числа (НУ) от плотности раствора хлорида натрия NaCl ρ (г/см³). Заполните табл. 9 и постройте на основании ее данных графики соответствующих зависимостей.

Таблица 8

Результаты измерений (Na_2CO_3)

№ п/п	Концентрация раствора, %	Плотность раствора ρ , г/см ³	Коэффициент ослабления μ , 1/см	КТ-число (HU)
1	5	1,050		
2	10	1,105		
3	15	1,160		
4	17,7 (насыщ.)	1,190		

Таблица 9

Результаты измерений (NaCl)

№ п/п	Концентрация раствора, %	Плотность раствора ρ , г/см ³	Коэффициент ослабления μ , 1/см	КТ-число (HU)
1	5	1,030		
2	10	1,070		
3	15	1,110		
4	20	1,148		
5	25	1,189		

Примечание. Для значений «Коэффициент ослабления μ » и «КТ-число (HU)» в таблицах с полученными данными имеется в виду среднее значение указанных величин. Коэффициенты ослабления и КТ-числа определяются отдельно для каждого пикселя получаемой реконструкции. При анализе томографических сечений можно наблюдать, что значения коэффициента ослабления μ (1/см) и КТ-числа (HU) различаются в различных точках. Однако данные различия вызваны не пространственной (или иной) неоднородностью исследуемой жидкости, а связаны с алгоритмом реконструкции. Эти различия обычно незначительны ($< 10\%$). В качестве результирующего значения коэффициента ослабления μ (1/см) и КТ-числа (HU) следует брать среднее арифметическое между наибольшим и наименьшим значением соответствующих величин для отдельных пикселей реконструкции.

4. Подготовьте отчет по выполненной работе, который должен содержать:

- краткую теорию;
- таблицы с экспериментальными данными;
- графики зависимостей коэффициентов ослабления и КТ-чисел от плотности для растворов Na_2CO_3 , NaCl и для набора органических жидкостей;
- анализ результатов и выводы.

Сделайте выводы и ответьте на вопросы:

1. Почему томографические изображения имеют лучшее качество, чем обычные рентгенограммы?

2. Какая физическая величина используется при построении томографических изображений?

3. Как определяют КТ-числа? Чему равно КТ-число воздуха? Воды?

4. Какое РИ используется в данной работе, если потенциал возбуждения характеристического спектра вольфрама равен 69 кВ?

5. Верно ли то, что с ростом плотности вещества коэффициент ослабления рентгеновских лучей убывает?

6. Почему при клинической КТ применяют РИ большой мощности?

ТЕМА 3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Лабораторная работа 5

ИЗУЧЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА НА КОМПЬЮТЕРНОЙ МОДЕЛИ

Молекулярная биофизика изучает строение и физико-химические свойства биологически функциональных молекул, прежде всего биополимеров — белков и нуклеиновых кислот. Молекулярная биофизика основана на раскрытии физических и химических механизмов, ответственных за структуру и биологическую функциональность молекул (например, за каталитическую активность белков-ферментов), а также на изучении физических и химических закономерностей, действующих на молекулярном уровне организации живого.

Белки — это многофункциональные молекулярные системы (они регулируют химические превращения в клетках, являются строительными блоками и оружием живой клетки, контролируют экспрессию генов, обеспечивают восприятие межклеточных сигналов, выполняют транспортную функцию по перемещению других молекул, обеспечивают биоэнергетику живых процессов и т. д.).

При всем разнообразии функций работа белков всегда базируется на высокоспецифическом взаимодействии белка с обрабатываемой им молекулой (ключ с замком). Для этого необходима достаточно твердая пространственная структура. Поэтому биологическая функция белков (как и других важнейших для жизни макромолекул — ДНК и РНК) тесно связана с определенностью их трехмерных структур. Не только разрушение, а даже небольшие изменения этих структур часто ведут к утере или резкому изменению активности белков. В основе белка лежит состоящая из аминокислотных остатков полипептидная цепь, которая имеет химически регулярный остов

(главную цепь), от которого отходят разнообразные боковые группы аминокислот — радикалы R_1, R_2, \dots, R_n (рис. 15, *a*). Есть двадцать основных аминокислотных остатков. Их положение в белковой цепи кодируется генами. Аминокислотная последовательность определяет пространственную структуру белка (рис. 15, *б–г*), а структура уже определяет его функцию.

В настоящее время известны сотни тысяч белковых аминокислотных последовательностей и тысячи пространственных структур белков (они хранятся в электронных компьютерных банках белковых структур). Архитектуры белков, особенно глобулярных водорастворимых белков, сложны и разнообразны.

a ...-Gly-Val-Tyr-Gln-Ser-Ala-Ile-Asn-Lys-Ala-...

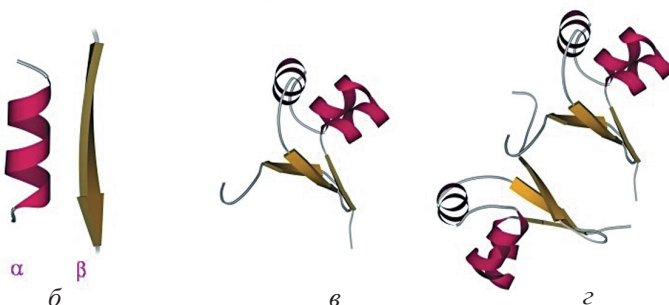


Рис. 15. Уровни организации белковой структуры
[Финкельштейн, Птицын, с. 17]:

a — первичная структура (аминокислотная последовательность); *б* — вторичная структура (альфа-спираль и один тяж бета-структуры); *в* — третичная структура глобулы, сложенной одной цепью; *г* — четвертичная структура (в данном случае — димерного) белка

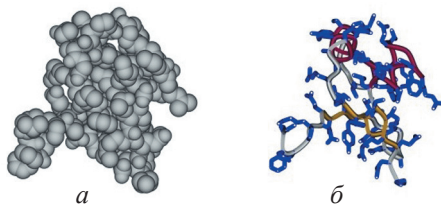


Рис. 16. Атомная модель белковой глобулы (*a*)
и ее скелетная модель (*б*) [Финкельштейн, Птицын, с. 21]

При рассмотрении различных структурных изображений белковых молекул складывается впечатление, что внутри белка много пустого пространства и, следовательно, что он мягкий, но на самом деле это не так. Белок — твердая белковая цепь, упакована очень плотно, атомы упираются в атомы (рис. 16). Строение белка неудобно изучать на полной атомной модели — внутреннее устройство белка можно увидеть, лишь сделав атомы «прозрачными» и обратив основное внимание на ход белковой цепи (скелетная модель). Полно-атомная же модель нужна для изучения функции белка — специфику его работы определяют именно физико-химические и геометрические свойства поверхности глобулы.

В состав белка, помимо самой белковой цепи, часто входят *кофакторы* — малые молекулы, ионы, сахара, нуклеотиды, фрагменты нуклеиновых кислот и т. д., т. е. относительно небольшие молекулы, принимающие участие в функционировании, а порой и в формировании структуры белковой молекулы. Кофакторы могут присоединяться к белку химическими связями, а могут просто «прилипать» нековалентно к определенным местам белковой глобулы.

Информация о пространственной структуре белка размещена в специальной *базе данных белковых структур (protein data base, PDB)**. Здесь собрана информация о трехмерной структуре белков и нуклеиновых кислот. Информацию о структуре биомолекул, которую заносят в PDB, получают с помощью рентгеновской кристаллографии или спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Данные о белковых структурах хранятся в файлах, имеющих расширение .pdb — в *молекулярных файлах*. Чтобы перевести подобный файл в изображение, используются специальные компьютерные программы. Одной из таких программ является «RasTop».

Ц е л ь р а б о т ы: научиться визуализировать и обрабатывать молекулярные структуры биополимеров с помощью программы «RasTop».

* Открытая база данных PDB постоянно пополняется, и в нее можно войти через сеть Интернет по адресу: <http://www.rcsb.org/pdb/>.

Оборудование и материалы

Персональный компьютер; программа «RasTop»; доступ к базе данных белковых структур через сеть Internet.

Ход работы

1. С помощью исполнительного файла (RasTop.exe) откройте программу «RasTop» на своем компьютере.

2. Войдите на сайт базы данных PDB. На первой странице сайта в поисковом окне («Search the Archive») нужно ввести либо название белка, либо фамилию автора, либо идентификационный код белка, если он известен (PDB ID or keyword).

3. В поисковое окно введите название «Human Myoglobin» и нажмите кнопку «Search». Повторите ту же операцию, но вместо названия введите идентификационный код (3RGK). Открывается список найденных белковых структур.

4. Загрузите на компьютер молекулярный файл для последующей работы через окно загрузки («Download/Display»), откройте в программе «RasTop» (рис. 17).

5. Используйте возможности интерфейса программы для визуализации молекулярных структур.

Работа с программой «RasTop»

Центральная часть основного окна (рис. 17) занята изображением структуры белка или его части. Выше расположены 4 строки надписей и иконок.

- Первая строка — содержит название файла и название белка.
- Вторая строка — меню команд со списками ниспадающих команд.

• Третья строка. В а ж н ы е к л а в и ш и:

1) клавиша, размещающая открытые окна рядом друг с другом (рис. 17);

2) атомы в виде сфер с радиусами Ван-дер-Ваальса («Sphere VDW»);

3) атомы в виде крестиков, без связей («Star»);

4) связи в виде тонких проволок, без атомов («Wire frame»);

5) атомы в виде небольших шариков, а связи — в виде тонких палочек («Ball and Stick»);

6) связи в виде цилиндрических палочек, атомы не показаны («Stick»);

7) из изображения удаляются все выделенные элементы;

8) включение изображения вторичной структуры полипептидной цепи в виде плоских лент (бета-складки), скрученных лент (альфа-спиральные участки) и нитей (участки с неупорядоченной структурой) («Ribbons»);

9) наложение на существующую картину изображений атомов в виде «полупрозрачных» шариков с радиусами Ван-дер-Ваальса («Display dots»). Стереть облако из точек можно только через команды меню второй строки («Surfaces/Remove dots»);

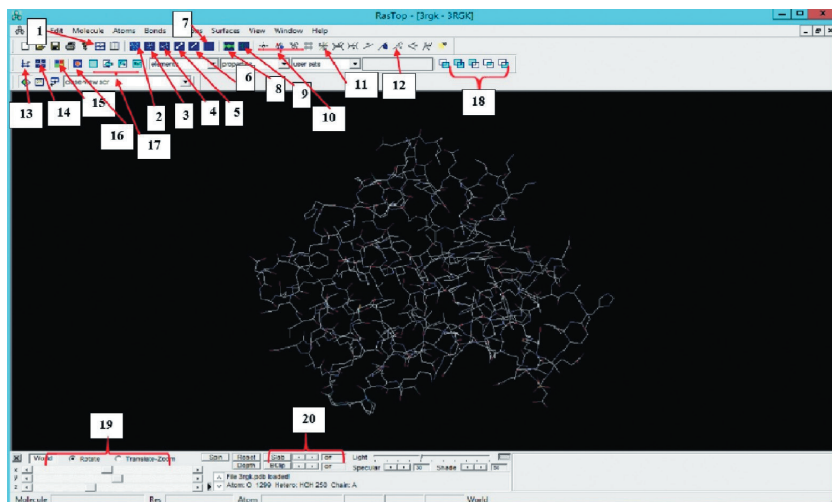


Рис. 17. Активное окно программы «RasTop». Открыт файл 3rgk.pdb

10) три клавиши, благодаря которым возможно выделить атомы («Atoms»), группы («Residues») или целые полипептидные цепи («Chains»);

11) клавиша «Centre» по умолчанию помещает центр вращения вокруг центра тяжести элементарной ячейки (декартова система координат — «World»). Чтобы переместить центр вращения, нужно нажать клавишу, навести курсор на выбранный атом, нажать левую кнопку мыши и освободить клавишу «Centre»;

12) клавиша «Distances» позволяет измерить расстояние между атомами в ангстремах.

- Четвертая строка. Важные клавиши:

13) изменение типа системы координат («Coordinates»);

14) на рисунке появляются оси («World Axes») системы координат (x, y, z);

15) шкала для раскраски атомов, фона и т. д. («Color Picker»);

16) режим просмотра выделений («Show selection»);

17) 4 клавиши выделения объектов: «All» — выделить все; «Previous» — перейти к предыдущему выделению; «Inverse» — инвертированное (обратное) выделение; «Expression» — выделенные объекты можно задать словами в меню;

18) клавиши действия с выделенными элементами: «New» — предыдущее выделение заменяется; «Add» — добавляет элемент к предыдущему выделению; «Remove» — удаление элемента; «Extract» — из предыдущего выделения оставляет выделенным(и) только данный элемент(ы); «Exclude» — добавляет новое выделение, а затем удаляет из суммы все элементы предыдущего выделения.

Окна «Elements» и «Properties» с выпадающим меню работают вместе с клавишами действия. Помогают найти структуру в визуализированной молекуле.

Перемещение и вращение структур, послойные срезы

19) Доступна панель перемещения и вращения изображения на экране. Она находится в левой нижней части экрана. Действия контролируются с помощью ползунков. Кроме этого, поворот и вращение структур можно осуществлять с помощью правой и левой клавиш мыши и кнопки «Shift»;

20) операция «Slab» — удаление слоя передней части изображения, параллельного экрану. Стрелки справа позволяют изменять расстояние от этой секущей плоскости от начала координат. Операция «Vclip» — срез задней части изображения. Благодаря этим операциям появляется возможность получать слой молекулы определенной толщины (рис. 18, 19).

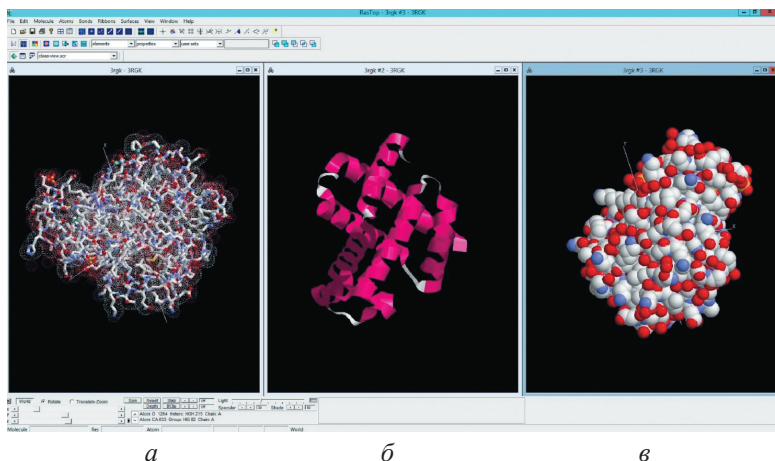


Рис. 18. Изображение структуры миоглобина человека в трех окнах:

a — молекула миоглобина, изображенная в виде цилиндрических палочек [«Sticks»], на которые наложены изображения атомов в виде полупрозрачных сфер [«Surfaces/Display Dots»]; *б* — ленты [«Ribbons/Display only»], окрашенные в соответствии с типом вторичной структуры [«Atoms/Color/Structure»]; *в* — та же молекула, в которой атомы даны в виде сфер с радиусами Ван-дер-Ваальса. Окраска атомов везде дана по системе СРК: углерод — серые шарики, азот — синие, кислород — красные, железо — желтый шарик

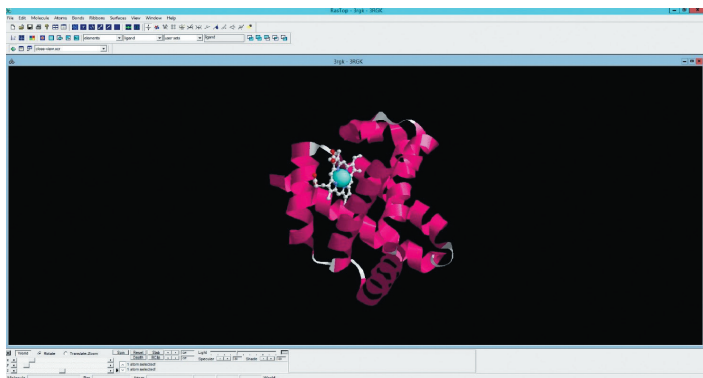


Рис. 19. Пример визуализации молекулярной структуры миоглобина.

Показаны ленты, окрашенные в соответствии с типом вторичной структуры. Атомы гема показаны в виде шариков, связи между ними — в виде палочек. Атом железа представлен в виде шарика с радиусом Ван-дер-Ваальса

Задания:

- На сайте белковых структур найдите и скачайте молекулярные файлы: коллагена, сывороточного альбумина человека и быка, алкогольдегидрогеназы, гемоглобина и ДНК человека.
- Для всех белков отобразите вторичную структуру в виде лент, наложите «полупрозрачные» шарики с радиусами Ван-дер-Ваальса.
- Для молекулы ДНК сделайте окрашивание по структуре, наложите «полупрозрачные» шарики с радиусами Ван-дер-Ваальса.
- Для молекулы гемоглобина удалите три цепи из четырех, оставшуюся представьте в виде лент (окраска по вторичной структуре), гем представьте в виде палочек, выделите атом железа и представьте его в виде шарика с радиусом Ван-дер-Ваальса. Окрасьте атом железа в любой цвет, кроме черного.
- Сохраните полученные изображения, распечатайте и вклейте в тетрадь. Опишите строение и структуру визуализированных молекул.

Сделайте выводы и ответьте на вопросы:

1. Назовите ковалентные типы связей в белковой молекуле.
2. Перечислите нековалентные типы взаимодействий атомных групп в белках с указанием уровней структурной организации молекул, на которых они проявляются.
3. За счет каких атомных групп образуется пептидная связь?
4. Перечислите основные характеристики для первичной, вторичной, третичной и четвертичной структур белковых молекул.

Лабораторная работа 6

ИЗУЧЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПО СОДЕРЖАНИЮ ТБК-РЕАКТИВНЫХ ПРОДУКТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

*(метод А. Кона и В. Ливерсейджа в модификации
Ю. Владимирова и А. Арчакова)*

В последние годы широко обсуждается роль активных форм кислорода (АФК) и инициируемых ими свободнорадикальных процессов при различных патологических процессах, а также при беременности. В нормальных условиях активность этих процессов находится на невысоком уровне, но при стрессовых ситуациях происходит усиленное образование АФК, под действием которых происходит избыточная и неконтролируемая активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), что в конечном итоге может привести к патологическому состоянию, которое сопровождается дисбалансом ферментативных и неферментативных компонентов системы антиоксидантной защиты.

Характерным проявлением окислительного стресса является интенсификация процессов перекисного окисления липидов, индикатором которой служит увеличение содержания хотя бы одного из его продуктов. Данные о содержании продуктов ПОЛ в биологических объектах могут нести в себе информацию о глубине и степени патологического процесса. В качестве количественных маркеров наиболее часто используются такие интермедиаты ПОЛ, как диеновые конъюгаты (ДК), а также один из его конечных продуктов — малоновый диальдегид (МДА).

Вследствие индукции перекисного окисления липидов клеточных мембран и липопротеинов крови в организме накапливаются различные дериваты полиненасыщенных жирных кислот. Активность ПОЛ оценивают по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), основную массу которых составляет малоновый диальдегид. Возможна частичная реакция ТБК с различными альдегидами, аминокислотами, веществами,

содержащими SH-, NH₂-группы, поэтому при использовании метода говорят об изменении концентрации не МДА, а ТБК-реактивных продуктов или МДА-подобных соединений.

Принцип метода

В основе метода лежит реакция между МДА и 2-ТБК, которая при высокой температуре и кислом значении pH протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего 1 молекулу МДА и 2 молекулы ТБК. Максимум поглощения этого комплекса определяется при длине волны 532 нм (рис. 20).

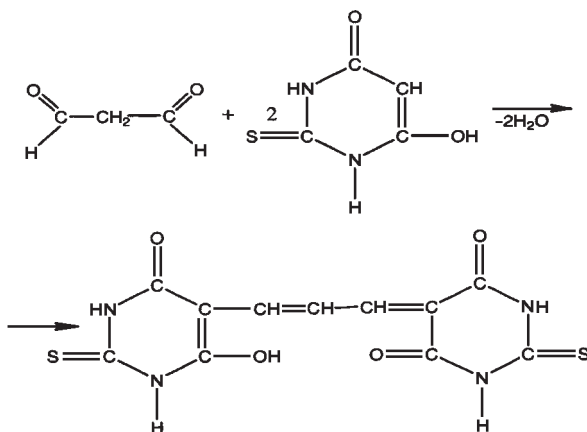


Рис. 20. Реакция между малоновым диальдегидом и 2-ТБК с образованием триметинового комплекса

Цель работы: определить содержание количественного маркера ПОЛ — малонового диальдегида (МДА) в плазме крови при разных условиях.

Оборудование и материалы

Центрифуга лабораторная; дозаторы; наконечники для дозаторов; центрифужные пробирки; пластиковые пробирки; термостат; водяная баня; фотоколориметр; кюветы толщиной 1 см; биологический материал — цельная кровь крысы.

Ход работы

Приготовьте реактивы:

1) 1МТрис-НСl (рН = 7,2): 12,11 г Трис (оксиметиламинометана) растворите в 80 мл дистиллированной воды. Доведите рН концентрированной соляной кислотой до 7,2 (необходимо использовать рН-метр), затем доведите объем раствора до 10 мл и тщательно перемешайте;

2) перекись водорода;

3) 0,5 mM ЭДТА- Na_2 : 7,31 мг (навеску взвешивайте на аналитических весах) разведите в 50 мл дистиллированной воды;

4) 10 % трихлоруксусная кислота: 10 г ТХУ на 100 мл дистиллированной воды;

5) 0,8 % раствор тиобарбитуровой кислоты: навеску (0,08 г) растворите в 10 мл дистиллированной воды при нагревании (на водяной бане — непосредственно в день занятия).

Далее действуйте по следующему алгоритму (табл. 10):

1. Получите из хвостовой вены или бедренной артерии крысы 7–10 мл цельной крови и центрифугируйте в течение 15 минут при 3 000 об./мин.

2. В первую пробирку добавьте 0,5 мл дистиллированной воды, еще в четыре пробирки добавьте по 0,5 мл плазмы крови.

3. К 0,5 мл дистиллированной воды прибавьте 1,5 мл буфера.

4. К 0,5 мл плазмы прибавьте 1,5 мл буфера.

5. К 0,5 мл плазмы прибавьте 1,5 мл буфера и поместите в термостат при 37 °С на 30 минут.

6. К 0,5 мл плазмы прибавьте 1,125 мл буфера, 0,375 мл H_2O_2 и поместите в термостат при 37 °С на 30 минут.

7. По окончании инкубации во все пробирки добавьте 1,0 мл 10 % раствора ТХУ (способствует осаждению белков).

8. Все 5 пробирок поместите в кипящую баню на 15 минут, после чего пробы охладите под струей водопроводной воды и центрифугируйте в течение 10 минут при 3 000 об./мин.

9. Оптическую плотность надосадочной жидкости опытных проб измерьте в кюветах толщиной 1,0 см при длине волны 530–540 нм против контрольной пробы.

Инкубационные смеси

Цельная кровь — 7–10 мл

Центрифугирование для получения плазмы. Режим: 3 000 об./мин, 15 мин

1-я пробирка (контроль)	2-я пробирка (без воздействия)	3-я пробирка	4-я пробирка	5-я пробирка
0,5 мл дистил. воды	0,5 мл плазмы	0,5 мл плазмы	0,5 мл плазмы	0,5 мл плазмы
1,5 мл Трис-НСl буфера	1,5 мл Трис-НСl буфера	1,5 мл Трис-НСl буфера	1,125 мл Трис-НСl буфера	1,125 мл Трис-НСl буфера
—	—	—	0,375 мл H_2O_2	0,375 мл ЭДТА- Na_2
—	—	Инкубация 37 °С, 30 мин	Инкубация 37 °С, 30 мин	Инкубация 37 °С, 30 мин

Добавить во все пробирки 1,0 мл 10 % раствора ТХУ

Добавить во все пробирки 1,0 мл 0,8 % свежеприготовленного раствора ТБК

Инкубация 100 °С, 15 мин (кипящая водяная баня)

Центрифугирование: 3 000 об./мин, 10 мин

Измерение оптической плотности надосадочной жидкости

10. Измерьте оптическую плотность проб, рассчитайте концентрацию малонового диальдегида по формуле, учитывая коэффициент молярной экстинкции:

$$C = E / 1,56 \cdot 10^5 \cdot V,$$

где V — объем вносимой плазмы крови, в литрах; $1,56 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ — коэффициент молярной экстинкции триметинового комплекса; E — экстинкция опытной пробы; C — концентрация малонового диальдегида, мкмоль/л.

11. Внесите полученные результаты в табл. 11.

Таблица 11

Влияние факторов среды на интенсивность ПОЛ в плазме крови крысы в опытах *invitro*

Условия опыта	Оптическая плотность (D)	[МДА], мкмоль/л
Без воздействия		
+ 37 °С		
+ H ₂ O ₂		
+ ЭДТА-Na ₂		

Сделайте выводы и ответьте на вопросы:

1. Какое влияние оказывают различные факторы среды (температура, прооксиданты, антиоксиданты) на интенсивность процесса ПОЛ?
2. Какую роль в этом процессе играет перекись водорода?
3. Какими свойствами обладает ЭДТА-Na₂?

ТЕМА 4. БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Лабораторная работа 7

БИОФИЗИКА МЕМБРАН. КИСЛОТНЫЙ И ЩЕЛОЧНОЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

Эритроциты — высокоспециализированные безъядерные клетки крови. Ядро у них утрачивается в процессе созревания. Эритроциты имеют форму двояковогнутого диска. В среднем их диаметр около 7,5 мкм, а толщина на периферии 2,5 мкм. Благодаря такой форме увеличивается поверхность эритроцитов для диффузии газов и возрастает их пластичность. За счет высокой пластичности они деформируются и легко проходят по капиллярам. У старых и патологических эритроцитов пластичность низкая, в результате чего они задерживаются в капиллярах ретикулярной ткани селезенки и там разрушаются.

Мембрана эритроцитов и отсутствие ядра обеспечивают их главную функцию — перенос кислорода и участие в переносе углекислого газа. Мембрана эритроцитов, помимо того, что хорошо пропускает молекулы кислорода и углекислого газа, практически непроницаема для катионов, кроме калия, а ее проницаемость для анионов хлора, гидрокарбонат анионов и гидроксил анионов в миллион раз больше. Мембрана содержит до 52 % белка от общего количества молекул, в частности, гликопротеины определяют групповую принадлежность крови и обеспечивают ее отрицательный заряд. В нее встроена Na/K-АТФаза, удаляющая из цитоплазмы натрий и закачивающая ионы калия. Основную массу эритроцитов составляет гемопrotein гемоглобин. Кроме того, в цитоплазме содержатся ферменты карбоангидраза, фосфатазы, холинэстераза и другие ферменты.

Г е м о л и з — разрушение мембраны эритроцитов и выход гемоглобина в плазму (в результате кровь становится прозрачной).

Причинами гемолиза могут быть как дефекты эритроцитов, так и внешние воздействия. Различают следующие виды гемолиза:

1. *Естественный (физиологический) гемолиз*. Происходит в организме непрерывно при завершении жизненного цикла эритроцитов (продолжительность жизни эритроцитов составляет 100–130 дней). Также обеспечивает разрушение патологических форм эритроцитов. Имеется два механизма. Внутриклеточный гемолиз происходит в макрофагах селезенки, костного мозга, клетках печени. Внутрисосудистый — в мелких сосудах, из которых гемоглобин с помощью белка плазмы гаптоглобина переносится к клеткам печени. Там гем гемоглобина превращается в билирубин. В сутки в организме человека разрушается около 6–7 г гемоглобина.

2. *Химический гемолиз*. Возникает при воздействии на эритроциты веществ, растворяющих липиды мембраны. Это спирты, эфир, хлороформ, щелочи кислоты и т. д. В частности, при отравлении большой дозой уксусной кислоты возникает выраженный гемолиз.

3. *Температурный (термический) гемолиз*. При низких температурах в эритроцитах образуются кристаллики льда, разрывающие их оболочку.

4. *Биологический гемолиз*. Происходит при действии разнообразных биологических факторов, таких как гемолитические яды бактерий, насекомых, змей, а также в результате переливания несовместимой крови.

5. *Осмотический гемолиз*. Возникает в том случае, если эритроциты попали в среду с осмотическим давлением ниже, чем у крови. Вода входит в эритроциты, они набухают и лопаются. При помещении эритроцитов в среду с большим, чем у крови осмотическим давлением происходит плазмолиз. Это сморщивание эритроцитов. Его используют для подсчета эритроцитов.

6. *Механический гемолиз*. Наблюдается при механических разрывах мембраны. Например, при встряхивании флакона с кровью или ее перекачивании аппаратом искусственного кровообращения.

Эритроциты, помещенные в кислую среду, проявляют ярко выраженную гемолитическую реакцию. Другой способ вызвать гемолиз эритроцитов — это помещение крови в изотоническую среду, в которой катион натрия заменен катионом аммония. В обоих

случаях ключевым механизмом, запускающим реакцию гемолиза, является функционирование Cl^-/OH^- -обменника, реагирующего на изменение мембранного градиента pH. Как уменьшение внеклеточного pH (в случае кислотного гемолиза), так и увеличение внутриклеточного pH (в аммонийной среде) приводит к активации обменника и поступлению ионов хлора в клетку. Параллельно наблюдается поступление ионов натрия (Na/H -антипортер, или Na -канал) и воды, в результате клетка набухает до критического размера и гемолизует.

Величины диаметров эритроцитов образуют кривую нормального распределения (кривую Прайс-Джонса). Средняя величина диаметра эритроцита у крысы равна 6,2 мкм. При нарушении эритропоэза происходит сдвиг кривой Прайс-Джонса вправо, наблюдается так называемый макроцитоз, т. е. значительное увеличение числа эритроцитов с диаметром, превышающим 8 мкм. Сдвиг кривой Прайс-Джонса влево, т. е. существенное увеличение числа эритроцитов с диаметром менее 6 мкм, называется микроцитозом, в этом случае в крови обнаруживаются карликовые эритроциты с укороченным сроком жизни, диаметр их может составлять всего 2,2 мкм. Уплотнение кривой Прайс-Джонса в результате увеличения числа как макроцитов, так и микроцитов характерно для анизоцитоза.

Ц е л ь р а б о т ы: экспериментально получить гемолиз эритроцитов разными способами, получить данные по распределению диаметров эритроцитов крови с помощью лазерного анализатора частиц.

Задачи:

- Экспериментально получить гемолиз эритроцитов в изотонической среде, вызванный изменением физико-химических свойств среды при добавлении в нее HCl .
- Экспериментально получить аммонийный гемолиз эритроцитов, вызванный помещением суспензии крови в гипоосмотическую среду, в которой ионы натрия частично замещены ионами аммония.
- Сравнить механизмы щелочного и кислотного гемолиза, объяснить разницу во времени гемолитической реакции при разных видах гемолиза.

- Получить данные по распределению диаметра эритроцитов крови, сравнить ее с распределением Прайс-Джонса.

Оборудование и материалы

Лазерный анализатор микрочастиц «Ласка».

Описание лазерного анализатора

«Ласка» — прецизионный прибор для гранулометрического анализа и исследования кинетических процессов дисперсных систем. Анализатор для измерения дисперсных параметров (распределение частиц по размерам) суспензий, эмульсий и порошкообразных материалов. Диапазон измерения: 0,5–100 мк. Гранулометрический анализ (расчет функции распределения частиц по размерам) осуществляется путем математической обработки результатов радиального распределения интенсивности света, рассеянного микрочастицами анализируемых образцов (рис. 21).

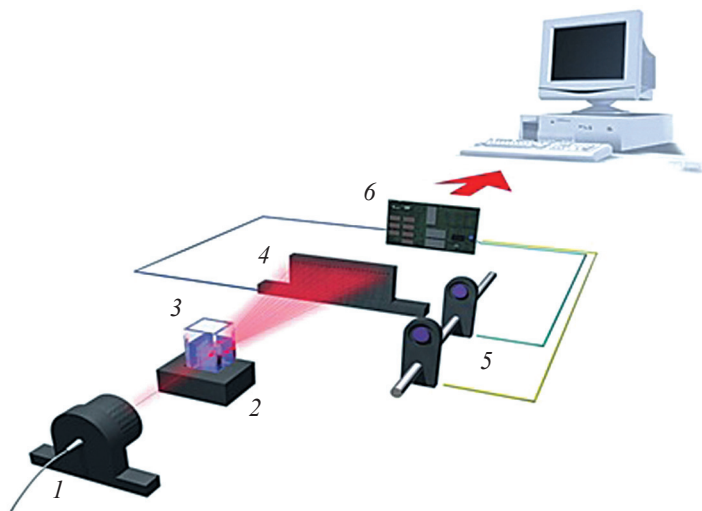


Рис. 21. Схема устройства лазерного анализатора микрочастиц «Ласка»: 1 — лазерный диод (670 нм); 2 — кюветное отделение с элементом Пельтье; 3 — кювета с магнитным волчком; 4 — линейка фотодиодов (малые углы рассеяния); 5 — фотодиоды (большие углы рассеяния); 6 — контроллер

Источником излучения является лазерный диод. Приемники излучения — линейки фотодиодов — служат для преобразования световых сигналов в электрические в соответствующих измерительных каналах.

Оптическая схема анализатора обеспечивает прохождение светового луча от лазерного диода через фокусирующую линзу, диафрагму, рабочую ячейку с пробой и далее на соответствующую линейку фотодиодов.

В общем виде метод лазерного рассеяния реализуется по следующей схеме: через кювету с суспензией частиц пропускается световой пучок когерентного излучателя (лазера); с помощью многоэлементного фотоприемника измеряется радиальное распределение интенсивности $I(\beta)$, рассеянного ансамблем микрочастиц; из данных радиального распределения интенсивности вычисляется функция распределения частиц по размерам $f(a)$. По способу реализации метод относится к интегрально-оптическим методам.

Ход работы

1. Приготовление изотонических сред из маточных растворов.

Навески маточных растворов:

- 1) 7,45 г KCl;
- 2) 5,84 г NaCl;
- 3) 6,93 г $\text{CaCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$;
- 4) 18,02 г $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (глюкоза);
- 5) 5,77 г HEPES.

Все навески доведите до 50 мл дистиллированной водой. Тщательно перемешайте до полного растворения. Измерьте концентрацию pH раствора HEPESa. Водородный показатель должен быть 7,4. При неверном значении доводим его до правильного с помощью раствора HCl (если значение выше) либо раствора NaOH (если значение ниже).

Готовим *изотонический раствор* из расчета на 100 мл (среда 1):

KCl — 0,25 мл;
NaCl — 7 мл;
 $\text{CaCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,2 мл;
 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ — 0,25 мл;
HEPES — 1 мл.

Готовим *гипоосмотический раствор* из расчета на 100 мл (среда 2):

NH_4Cl — 7 мл;
KCl — 0,25 мл;
 $\text{CaCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,2 мл;
 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ — 0,25 мл;
HEPES — 1 мл.

Раствор НЕРЕСа при смешивании добавляем в последнюю очередь. Доводим до нужного объема дистиллированной водой.

В качестве образца крови используем кровь крысы из хвостовой вены. При взятии крови добавляем в пробирку 1 мл изотонической среды (среда 1) и каплю образца крови.

2. Измерение данных о времени гемолиза с помощью лазерного анализатора микрочастиц «Ласка».

Перед работой прибора необходимо произвести его калибровку.

Режим калибровки:

1. При *выключенном лазере* (обязательно) одновременно нажимаются кнопки 1 и 3. При этом на дисплее 1 появляются надписи «□» и «I», на остальных дисплеях в этот момент информация не выводится.

2. При последующем нажатии кнопки 2 наблюдается замена символа «I» на «□».

3. После заполнения всех ячеек символом «□» включается лазер и ожидается около 1–2 мин (время, необходимое для выхода лазера на стабилизированный режим).

4. Далее нажимается кнопка 2, при этом на дисплее 1 появляются надписи «□» и «П», на остальных дисплеях в этот момент информация не выводится.

5. При последующем нажатии кнопки 2 наблюдается замена символа «I» на «□».

6. После заполнения всех ячеек символом «□» выход из режима калибровки осуществляется *двукратным* одновременным нажатием кнопок 3 и 4.

После калибровки кнопками 1, 2 (или 3, 4) на дисплее 1 (или 3) устанавливается угол 0 (град.), при этом на дисплее 2 (или 4) показания должны быть около 100 (%). Допускается отклонение от показаний в 2 %. Показания интенсивности в других углах должны быть близкими к 0 (допустимо отклонение в 2–3 ед.).

Процедуру калибровки следует проводить еще раз в случае, если показания в канале «0 град.» отклоняются от 100 более чем на 10 % (т. е. < 90 или > 110).

Если прибор готов к работе, запускаем программу «LaSca_32.exe».

3. Получение гемолиза эритроцитов в эксперименте.

Приготовьте суспензию анализируемого образца.

Кислотный гемолиз

Возьмите чистую кювету с магнитным волчком и налейте в нее изотоническую среду (8 мл). Поместите кювету в кюветное отделение и включите мешалку. Включите запись эксперимента — опция «Измерение-Старт». В верхнем левом углу расположены кнопки управления (начало и остановка процесса, открытие и сохранение файлов). Внизу даются координаты курсора мышки и — при записи — текущие значения активной кривой. По оси абсцисс фиксируется время эксперимента, по оси ординат — показания сигнала в mV. После записи исходного фона в кювету микропипеткой добавляется суспензия приготовленного образца.

Добавляйте суспензию крови до тех пор, пока значение по оси ординат не достигнет 50 (в растворе соотношение клеток крови и изотонического раствора становится 50 : 50).

При достижении этого значения добавляем 10 мкл HCl и фиксируем через некоторое время кислотный гемолиз.

Аналогичным образом получаем кислотный гемолиз эритроцитов, но уже при добавлении 15 мкл HCl. Фиксируем время полного гемолиза.

Аммонийный гемолиз

В кювету с магнитным волчком поместите 8 мл гипотонической среды (среда № 2) и добавьте суспензию крови, пока значение по оси ординат не достигнет 50 (в растворе соотношение клеток крови и изотонического раствора становится 50 : 50). Фиксируем время аммонийного гемолиза эритроцитов.

Остановка эксперимента осуществляется принудительно через опцию «Измерение-Стоп» или автоматически по истечении установленного времени. Для обработки данных вводится маркер из правой панели иконок.

Маркер вводится на максимум, минимум или устанавливается на нужной кривой (при возникновении промежуточного окна). Далее выполняем нажатие опции «Расчет-Гранулометрия Int». После проведения анализа выводится окно «Расчет распределения частиц по диаметрам», в котором представлены исходные данные:

результаты расчета и графики распределения в интегральном и дифференциальном видах.

В окне предлагаются:

1. Вывод протокола анализа в формате Excel. При нажатии кнопки «Excel 2000» генерируется вывод протокола эксперимента в формате офисного приложения Excel, в котором делаются все необходимые текстовые пометки, и далее сохраняется как документ Excel.

2. Вывод протокола анализа в формате Word. При нажатии кнопки «Отчет» генерируется вывод протокола эксперимента в формате офисного приложения Word.

Запишите средний диаметр эритроцитов.

Сделайте выводы и ответьте на вопросы:

1. На чем основано измерение содержания и диаметров клеток крови с помощью лазерного анализатора частиц «Ласка 1» (физические методы регистрации)?

2. Каковы механизмы разных видов гемолиза (кислотного и щелочного)?

3. Какой вид гемолиза дольше по продолжительности и почему?

4. Объясните причину разницы во времени гемолиза эритроцитов при добавлении кислоты разной концентрации.

5. Сравните кривую распределения диаметров эритроцитов на пике набухания с нормой (распределением Прайс-Джонса). В случае наличия отклонения объясните его причину.

Лабораторная работа 8

БИОФИЗИКА МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ. ЭЛЕКТРОМИОГРАФИЯ. ПОПОЛНЕНИЕ ДВИГАТЕЛЬНЫХ ЕДИНИЦ. УТОМЛЕНИЕ

*(работа выполняется на учебном комплексе
«Biopac Student Lab»)*

Электрoмиoграфия — метод регистрации электрической активности мышечных волокон; регистрация суммарных колебаний потенциалов, возникающих как компонент процесса возбуждения в области нервно-мышечных соединений и мышечных волокнах при поступлении к ним импульсов от мотонейронов спинного или продолговатого мозга.

Электрoмиoграфия используется в диагностических целях, при заболеваниях мышц, а также при функциональных исследованиях двигательного аппарата.

В настоящее время применяются различные варианты подкожных (игольчатых) и накожных (поверхностных) электродов. Последние в силу их атравматичности и легкости наложения имеют более широкое применение.

Во время покоя скелетная мускулатура всегда находится в состоянии легкого тонического напряжения, что проявляется на электромиограмме (ЭМГ) в виде низкоамплитудных (5–30 мкВ) колебаний частотой 100 Гц и более. При готовности к движению, мысленному его выполнению, при эмоциональном напряжении и в других подобных случаях, т. е. в ситуациях, не сопровождающихся внешне наблюдаемыми движениями, тоническая ЭМГ возрастает как по амплитуде, так и по частоте. Например, чтение «про себя» сопровождается увеличением ЭМГ активности мышц нижней губы, а при мысленном письме у правой усиливается мышечная активность поверхностных сгибателей правой руки.

Амплитуда и частота ЭМГ прежде всего определяются количеством возбужденных двигательных единиц, а также степенью синхронизации развивающихся в каждой из них колебаний потенциала.

Амплитуда ЭМГ нарастает градуально, это связано с тем, что сначала активируются обладающие большей возбудимостью двигательные единицы, а затем вместе с ними начинают активироваться и другие двигательные единицы. Общая амплитуда ЭМГ может достигать 1–2 мВ.

Если потенциалы действия отводятся с помощью накожных электродов, то регистрируется *суммарная электромиограмма*. В этом случае регистрируемая электрическая активность отражает число активных, в данный момент времени, двигательных единиц, частоту колебаний потенциала в каждой из них и степень синхронизации возникающего в них возбуждения. Чем выше степень синхронизации, тем больше амплитуда потенциалов действия и меньше их частота. Десинхронизация проявляется в возникновении большого числа мелких колебаний при уменьшении количества волн большой амплитуды.

При субмаксимальных усилиях амплитуда потенциалов действия нарастает по мере выполнения работы, а их частота уменьшается, что свидетельствует о нарастающем *утомлении*. При максимальных нагрузках на мышцу отмечается высокая степень синхронизации, которая в конце удержания усилия, при развитии утомления, сменяется десинхронизацией, когда амплитуда потенциалов действия уменьшается.

Ц е л ь р а б о т ы: определить максимальную силу сжатия для правой и левой рук и сравнить различия между мужчиной и женщиной; пронаблюдать, зарегистрировать и соотнести пополнение двигательных единиц с увеличением мощности сокращения скелетной мышцы; зарегистрировать силу, произведенную мышцами при сжатии кулака, ЭМГ и интегрированную ЭМГ, стимулируя утомление.

Оборудование и материалы

BIOPAC SS25 ручной динамометр (SS25LA или SS25L); BIOPAC наушники (OUT1); BIOPAC набор электродных проводов (SS2L); BIOPAC одноразовые виниловые электроды (EL503), 6 электродов на человека; BIOPAC электродный гель (GEL1) и абразивные губки (ELPAD) или очищающее средство для кожи; персональный

компьютер; программное обеспечение «Biopac Student Lab» версия 3.7; ВІОРАС основной блок (MP36, MP35 или MP30 с кабелями и блоком питания).

Ход работы

- Включите ваш компьютер.
- Убедитесь, что блок ВІОРАС MP3X выключен.
- Подключите оборудование, как описано ниже:
 - ручной динамометр (SS25LA или SS25L) — канал 1 (CH1);
 - электродный провод (SS2L) — канал 3 (CH3);
 - наушники (OUT1) — задняя панель блока.
- Включите ВІОРАС MP3X блок.
- Расположите три электрода на предплечье (рис. 22).
- Подключите набор электродных проводов (SS2L) к доминирующей руке пациента, следуя цветовой схеме (см. рис. 22).
- Запустите программу «Biopac Student Lab».
- Выберите урок «ЭМГ II — Электромиография» и нажмите кнопку «ОК».
- Внесите свое уникальное имя файла, нажмите «ОК».

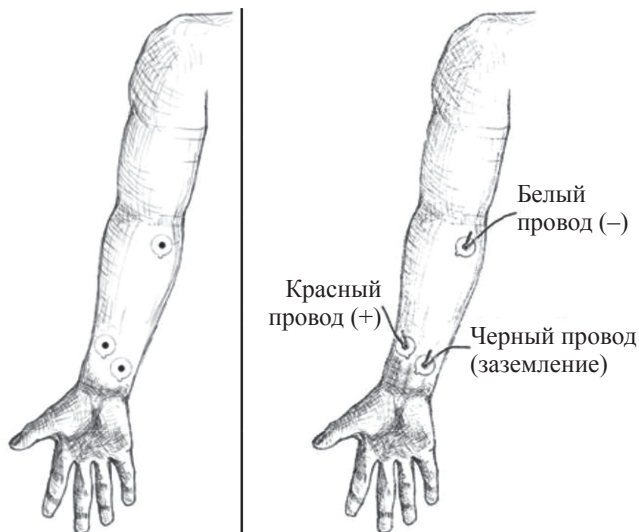


Рис. 22. Расположение электродов и подключение проводов

Прикрепите набор электродных проводов (SS2L) к доминирующему предплечью пациента для регистрации сегментов 1 и 2 (предплечье 1). Если пациент правша, то, скорее всего, доминирующая рука у него правая, а если левша, то левая. Для записи сегментов 3 и 4 (предплечье 2) необходимо будет прикрепить провода к недоминирующей руке пациента. Все электродные провода разного цвета, и каждый должен быть подключен к определенному электроду, как показано на рис. 22.

Для оптимального прилегания электродов к коже прикрепите их как минимум за 5 минут до начала процедуры калибровки.

Калибровка

Процедура калибровки устанавливает внутренние параметры оборудования (коэффициент усиления, отклонение, масштабирование) и необходима для оптимального функционирования прибора.

1. Выберите режим «Калибровка».
2. Отложите ручной динамометр и нажмите кнопку «ОК».
3. Сожмите рукой ручной динамометр BIOPAC.

SS25LA: обхватите динамометр так, чтобы короткая пластина прижималась к ладони.

SS25L: сожмите динамометр так, чтобы рука находилась максимально близко к скобе, *но не касалась ее* (рис. 23).



Рис. 23. Расположение руки на датчиках SS25LA и SS25L

Необходимо держать динамометр в одном и том же положении для всех измерений с обеих рук (запомните положение руки при записи первого сегмента и постарайтесь повторить его и для других сегментов).

4. Последовательно выполняйте инструкции всплывающих окон и нажимайте «ОК» после выполнения.

5. После начала регистрации калибровки подождите около 2 секунд, затем сожмите ручной динамометр максимально сильно и отпустите, расслабьте руку.

6. Дождитесь остановки калибровки.

7. Проверьте данные калибровки.

Всплывающее окно даст подсказку, что к ручному динамометру не должна применяться никакая сила сжатия. Для этого временно отложите динамометр. Уберите руки с датчика, чтобы убедиться, что к нему не приложена сила. Это обеспечит нулевую силу в начале калибровки. Сожмите динамометр доминирующей рукой. Всплывающие окна будут направлять вас в течение раздела калибровки. Регистрация калибровки начнется после нажатия кнопки «ОК» в третьем всплывающем окне. Программе необходимо считать максимум вашего сжатия для проведения автокалибровки. Процедура калибровки продлится 8 секунд и остановится автоматически, дайте ей завершиться. После завершения регистрации калибровки данные на экране должны быть подобны рис. 24.

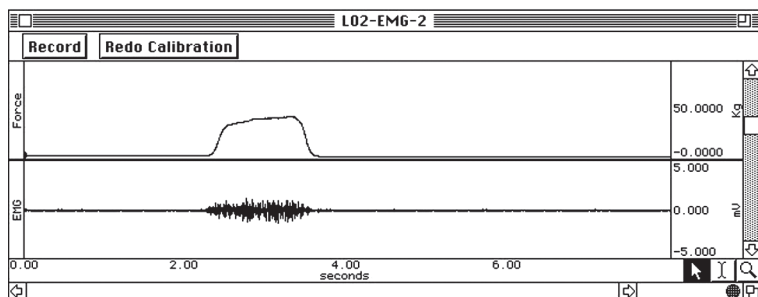


Рис. 24. Вид записи после правильной калибровки прибора

Регистрация данных

1. Приготовьтесь к регистрации. Вам предстоит зарегистрировать два сегмента для каждого предплечья:

— в сегментах 1 и 3 вы будете регистрировать пополнение двигательных единиц;

— в сегментах 2 и 4 — утомление.

Сегмент 1

2. Запомните указанную в журнале величину прироста силы сжатия. На основании вашей максимальной силы сжатия во время калибровки программа определяет оптимальную сетку дисплея и прирост силы. Посмотрите в журнал и используйте указанный прирост силы сжатия при ее увеличении во время регистрации. Сетка дисплея устанавливается следующим образом:

Калибровочное значение	Установленный прирост
0–25 кг	5 кг
25–50 кг	10 кг
Более 50 кг	20 г

3. Нажмите на опцию «Запись»; начнется регистрация и автоматически создастся метка добавления с текстом «Предплечье 1, увеличение силы сжатия». На экране появится сетка, на которой будут отображаться данные канала ручного динамометра. В качестве шкалы делений сетки используется заданный прирост силы, чтобы вы смогли визуальнo отслеживать уровень силы.

4. Сожмите-расслабьте-подождите и повторите с увеличением силы сжатия. Повторите цикл сожмите-расслабьте-подождите, сжимая кулак в течение 2 секунд и с интервалом в 2 секунды между сжатиями. Начните с указанного в шаге 2 прироста силы (5, 10 или 20 кг) и увеличивайте на заданный прирост (например, 5–10–15, 10–20–30 или 20–40–60) для каждого цикла до тех пор, пока не достигните максимальной силы сжатия.

5. Нажмите на опцию «Приостановить». Запись должна приостановиться, давая вам время на проверку данных и подготовку к следующему сегменту записи предплечья 1.

Если все было сделано правильно, ваши данные должны подходить на рис. 25.

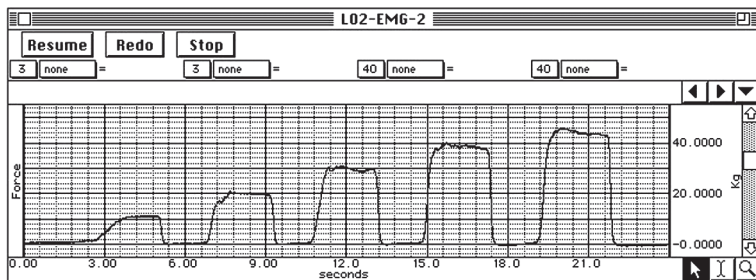


Рис. 25. Вид записи, характеризующий пополнение двигательных единиц

6. Проверьте данные на экране.

Сегмент 2

7. Нажмите на опцию «Продолжить»; регистрация продолжится и автоматически создастся метка добавления с текстом «Предплечье 1, продолжительное сжатие с максимальной силой».

8. Сожмите ручной динамометр с максимальной силой. Запомните эту силу и постарайтесь сохранять ее. Запомните максимальную силу сжатия, чтобы вы могли определить момент, когда сила понизится на 50 % (максимальная сила может выйти из поля зрения на экране). Постарайтесь сохранять максимальную силу сжатия (предплечье устанет и сила будет уменьшаться).

9. Когда сила сжатия, отображаемая на экране, понизится более чем на 50 %, нажмите на опцию «Приостановить». Время, за которое утомление достигает 50 % от максимальной силы сжатия, обычно сильно различается у разных людей. При нажатии на «Приостановить» запись должна приостановиться, давая вам время на изучение данных второго сегмента.

10. Изучите данные на экране. Если все было сделано верно, ваши данные должны походить на рис. 26. Заметьте, что пик, следующий сразу после начала записи сегмента 2, отражает максимальную силу сжатия. На представленном примере окна видна и точка утомления до 50 % от максимальной силы. Если это не так, вы можете использовать горизонтальную (временную) полосу прокрутки, чтобы увидеть вашу запись целиком.

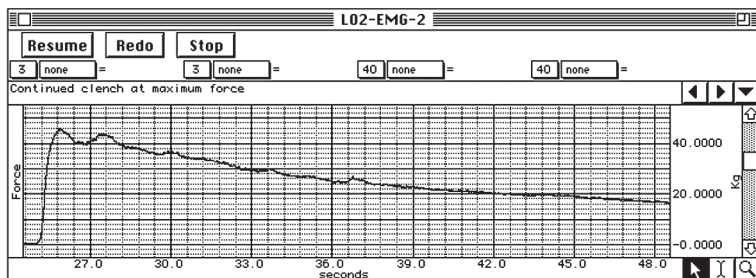


Рис. 26. Вид записи, характеризующий утомление

11. Подключите набор электродных проводов (SS2L) к недоминирующей руке пациента для регистрации следующего сегмента. Нажмите «ОК».

Сегмент 3

12. Для регистрации данных предплечья 2 подключите набор электродных проводов к недоминирующей руке пациента. Для сегментов 3 и 4 вы будете регистрировать данные предплечья 2 (недоминирующая рука), следуя тем же процедурам, что и для предплечья 1. Отсоедините провода (SS2L) от электродов, расположенных на предплечье 1, и подключите их к электродам на предплечье 2 (см. рис. 22).

13. Запомните указанную в журнале величину прироста силы сжатия. На основании вашей максимальной силы сжатия во время калибровки программа определяет оптимальную сетку дисплея и прирост силы. Посмотрите в журнал и используйте указанный прирост силы сжатия при ее увеличении во время регистрации.

14. Нажмите на опцию «Продолжить»; регистрация продолжится и автоматически создастся метка добавления с текстом «Предплечье 2, увеличение силы сжатия». Заметьте, что установленный для вас прирост силы является делением шкалы сетки канала ручного динамометра, чтобы вы могли визуальное отслеживать уровень силы сжатия.

15. Сожмите-расслабьте-подождите и повторите с увеличением силы сжатия. Повторите цикл сожмите-расслабьте-подождите,

сжимая кулак в течение 2 секунд и с интервалом в 2 секунды между сжатиями. Начните с указанного в шаге 2 прироста силы (5, 10 или 20 кг) и увеличивайте на заданный прирост (например, 5–10–15, 10–20–30 или 20–40–60) для каждого цикла до тех пор, пока не достигните максимальной силы сжатия.

16. Нажмите на опцию «Приостановить». Запись должна приостановиться, давая вам время на проверку данных и подготовку к следующему сегменту записи.

17. Проверьте данные на экране. Если все было сделано правильно, ваши данные должны походить на рис. 25.

Сегмент 4

18. Нажмите на опцию «Продолжить»; регистрация продолжится и автоматически создастся метка добавления с текстом «Предплечье 2, продолжительное сжатие с максимальной силой».

19. Сожмите ручной динамометр с максимальной силой. Запомните эту силу и постарайтесь сохранять ее, чтобы затем вы могли определить момент, когда сила понизится на 50 % (максимальная сила может выйти из поля зрения на экране). Постарайтесь сохранять максимальную силу сжатия (предплечье устанет и сила будет уменьшаться).

20. Когда сила сжатия, отображаемая на экране, понизится более чем на 50 %, нажмите на опцию «Приостановить». Время, за которое утомление достигает 50 % от максимальной силы сжатия, обычно сильно различается у разных людей. При нажатии на «Приостановить» запись должна приостановиться, давая вам время для просмотра (изучения) данных последнего записанного сегмента.

21. Изучите данные на экране. Если все было сделано верно, ваши данные должны походить на рис. 26.

22. Нажмите на опцию «Стоп»; появится окно диалога с вопросом подтверждения окончания регистрации данных с обоих предплечий. Это последняя возможность подтвердить отсутствие необходимости повторного проведения регистрации последнего сегмента. Нажмите на опцию «Да» для завершения регистрации и автоматического сохранения данных. Нажмите на опцию «Нет», если есть сомнения в верности данных, для возвращения к режиму регистрации с опцией «Переделать».

23. Нажмите на опцию «Выполнено».

24. Снимите электроды с предплечья. Отсоедините зажимные контакты, отклейте и выбросьте электроды (электроды ВЮРАС не допускают многократного использования). Смойте с кожи остатки электродного геля с помощью воды и мыла. После использования электродов на коже в течение нескольких часов могут оставаться слабые следы, что совершенно нормально.

Анализ полученных данных

1. Выберите параметр «Обзор записанных данных» и найдите нужный файл (в меню «Lessons»).

Для первой части анализа используйте данные, помеченные параметром «Увеличение силы сжатия», записанные в сегменте 1 (для предплечья 1) и в сегменте 3 (для предплечья 2). Внесите полученные результаты в табл. 12.

Таблица 12

Данные сегмента 1

№ пика	При-рост силы (кг)	Сегмент 1 — предплечье 1 (доминирующее)			Сегмент 3 — предплечье 2		
		Сила на пике [CH1] Ср. арифм. (кг)	Необработанная ЭМГ [CH3] Размах (P-P) (мВ)	Интегрированная ЭМГ [CH40] Ср. арифм. (мВ)	Сила на пике [CH1] Ср. арифм. (кг)	Необработанная ЭМГ [CH3] Размах (P-P) (мВ)	Интегрированная ЭМГ [CH40] Ср. арифм. (мВ)
1	кг						
2	кг						
3	кг						
4	кг						
5	кг						
6	кг						
7	кг						
8	кг						
9	кг						

Для второй части анализа используйте данные, помеченные параметром «Продолжительное сжатие с максимальной силой», записанные в сегменте 2 (для предплечья 1) и в сегменте 4 (для предплечья 2). Внесите полученные результаты в табл. 13.

Таблица 13

Данные сегмента 2

Сегмент 2 — предплечье 1 (доминирующее)			Сегмент 4 — предплечье 2		
Максимальная сила сжатия	50 % от максимальной силы сжатия	Время утомления	Максимальная сила сжатия	50 % от максимальной силы сжатия	Время утомления
СН1 величина	Рассчитать	СН40 дельта t^*	СН1 величина	Рассчитать	СН40 дельта t^*

* Вам не нужно обозначать полярность дельта t (времени утомления). Полярность измерения дельта t отображает направление I-образного курсора при выделении данных. Выделенные слева направо данные будут иметь положительный (+) знак, справа налево — отрицательный (–) знак.

Обратите внимание на обозначения номеров каналов (СН):

Канал —	Отображение
СН1 —	Сила
СН3 —	Необработанная ЭМГ
СН40 —	Интегрированная ЭМГ

Анализ параметра «Увеличение силы сжатия»

2. Настройте окно дисплея для оптимального отображения сегмента 1 регистрации. Сегмент 1 данных был зарегистрирован до первого маркера (рис. 27).

Следующие инструменты помогут вам настроить окно данных:

- Горизонтальный автомасштаб.
- Вертикальный автомасштаб.

- Курсор лупа.
- Вернуть увеличение.
- Горизонтальная полоса прокрутки (время).
- Вертикальная полоса прокрутки (амплитуда).

3. Прочтите в журнале и отметьте в «Результатах измерений» ваш прирост силы. В журнальной сводке записан прирост силы, заданный для вашей регистрации. Он же является делением сетки. Запишите эту величину в табл. 12 во вторую колонку «Прирост силы» для пика 1. Для последующих пиков прибавляйте величину прироста (т. е. 5, 10, 15 или 10, 20, 30 кг).

4. Установите следующим образом графы измерений:

<i>Канал —</i>	<i>Измерение</i>
CH1 —	Ср. арифм.
CH3 —	Размах (P-P)
CH40 —	Ср. арифм.

Кнопки измерений находятся над областью меток в окне данных. В каждом измерении выделяется три раздела: номер канала, тип измерения и результат. Первые два — «разворачиваемые» меню, которые активизируются при нажатии на них.

Краткое описание измерений

Ср. арифм.: отражает среднее значение на выделенном участке.

Размах (P-P): находит максимальное значение на выделенном участке и вычитает из него минимальное значение данного участка.

5. Используя I-образный курсор, выделите горизонтальный участок первого сжатия на графике (рис. 27). «Выделенный участок» — это область, выделенная I-образным курсором (включая конечные точки).

6. Повторите шаг 5 для горизонтальных участков каждого последующего сжатия.

7. Перейдите к сегменту 3 и установите настройки для оптимального его отображения. Сегмент 3 начинается после третьей метки добавления с текстом «Forearm 2, Increasing clench force» («Предплечье 2, увеличение силы сжатия»).

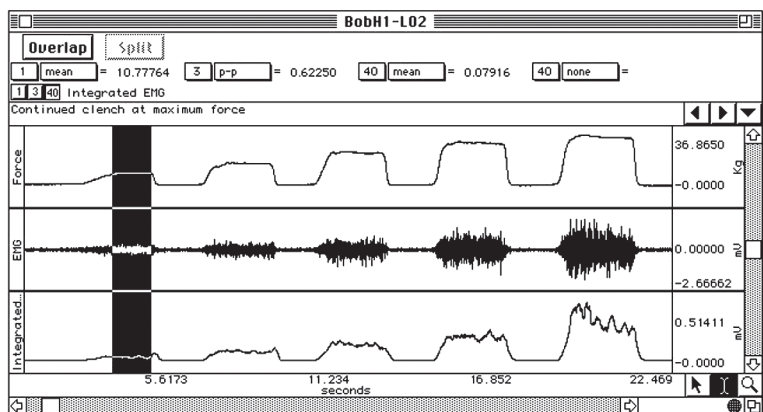


Рис. 27. Выделен горизонтальный участок первого сжатия

8. Повторите шаги 5 и 6 для сегмента 3. Внесите полученные измерения в табл. 12.

Анализ параметра «Продолжительное сжатие»

9. Перейдите к сегменту 2 и установите настройки для оптимального его отображения. Сегмент 2 начинается после второй метки добавления с текстом «Forearm 1, Continued clench at maximum force» («Предплечье 1, продолжительное сжатие с максимальной силой»).

10. Установите каналы вычислений следующим образом:

Канал —	Измерение
CH1 —	Значение
CH40 —	Дельта t

Краткое описание измерений

Значение: отображает величину амплитуды ЭМГ сигнала, момент, выделенный I-образным курсором. Если выбрана единственная точка, величина соответствует ей, если выделен участок, величина соответствует амплитуде в его конечной точке.

Дельта t : отражает временную протяженность выделенного сегмента (разница во времени между крайними точками выделенного участка).

11. Используя I-образный курсор, выделите точку с максимальной силой сжатия, следующую сразу же после начала сегмента (рис. 28).

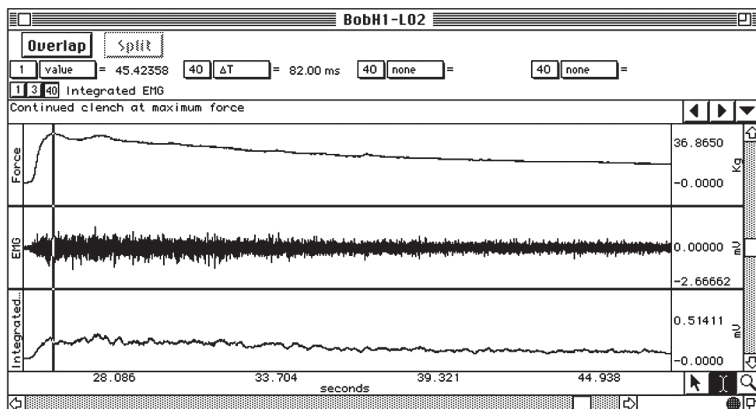


Рис. 28. Выбранная точка должна отражать максимальную силу сжатия в начале сегмента 2 (продолжительное максимальное сжатие), как показано на диаграмме

12. Рассчитайте 50 % от максимальной силы сжатия из шага 11 (вам понадобится это число в шаге 14).

13. Найдите точку с силой сжатия 50 % от максимальной силы сжатия с помощью I-образного курсора и оставьте курсор в этой точке. Выберите на глаз точку, отображающую силу сжатия, примерно равную 50 % от максимальной. Затем I-образным курсором нажимайте на точки в этом районе, обращая внимание на величину, отображаемую в графе измерений, пока вы не окажетесь в точке с силой сжатия 50 % от максимальной. Оставьте курсор в этой точке.

14. Выделите участок от точки с силой сжатия 50 % от максимальной силы сжатия и до точки с максимальной (100 %) силой сжатия с помощью I-образного курсора (рис. 29). Запомните величину времени утомления (CH40 delta (дельта t)). Способ выделения участка: курсор должен мигать на точке с силой сжатия в 50 % от максимальной силы сжатия. Удерживая кнопку мыши, двигайте мышь влево от этой точки, пока не достигнете точки с максимальной силой сжатия, затем отпустите кнопку мыши.

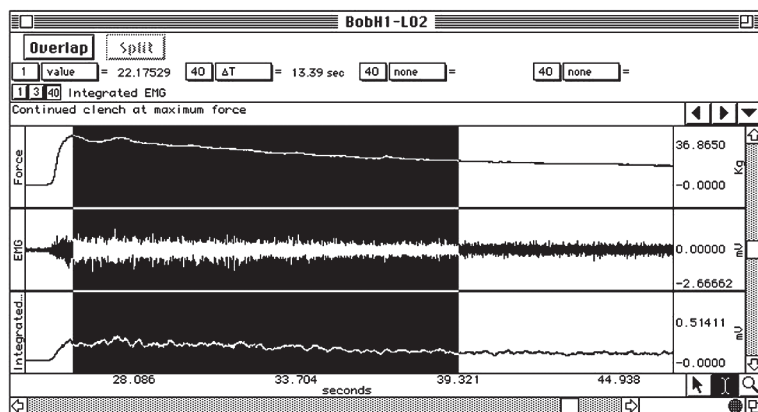


Рис. 29. Вид участка «50 % от максимальной силы сжатия»

15. Перейдите к сегменту 4 и установите настройки для оптимального его отображения. Сегмент 4 начинается после четвертой метки добавления с текстом «Forearm 2, Continued clench at maximum force» («Предплечье 2, продолжительное сжатие с максимальной силой»).

16. Повторите шаги 11–14 для сегмента 4. Внесите полученные измерения в табл. 13.

17. Сохраните или распечатайте файл с данными. Вы можете сохранить данные на жестком диске, сохранить записи из журнала или распечатать файл.

18. Выйдите из программы.

Обработка полученных данных

Укажите дату и данные пациента, на котором проводились измерения: имя, возраст, рост, вес, пол (мужской/женский), доминирующая рука (правая/левая).

Оценка процесса «Пополнение двигательных единиц»

Заполните табл. 12, используя данные сегментов 1 и 3. В графе «Прирост силы» для пика 1 отметьте прирост силы, заданный для вашей регистрации; прирост был внесен в ваш журнал и должен быть перенесен в таблицу из шага 2 «Анализа данных». Для следующих пиков прибавляйте прирост (5, 10, 15 или 10, 20, 30). Возможно, вам не понадобятся все 9 пиков для достижения максимума.

Оценка процесса «Утомление»

Заполните табл. 13, используя данные сегментов 2 и 4 для каждой руки.

Сделайте выводы и ответьте на вопросы:

1. Различается ли сила вашей правой и левой рук? (Да/нет).
2. Есть ли разница в абсолютных величинах силы, проявленной представителями женского и мужского полов вашей группы? (Да/нет). Чем можно объяснить эту разницу?
3. Остается ли неизменным число двигательных единиц, задействованных при удерживании какого-либо предмета в руке? Задействованы ли одни и те же двигательные единицы на протяжении всего процесса удерживания предмета?
4. При утомлении сила, осуществляемая мышцами, уменьшается. Какими биофизическими процессами объясняется уменьшение силы?
5. Дайте определение понятиям: «двигательная единица», «полноценные двигательные единицы», «утомление», «ЭМГ».

ТЕМА 5. МЕТОДЫ БИОФИЗИКИ

Лабораторная работа 9

КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Капиллярный электрофорез (КЭ) — группа относительно новых инструментальных методов анализа, реализуемых под действием электрического поля в капиллярах и основанных на различных принципах разделения. Капиллярный электрофорез позволяет не только определять, какие компоненты входят в состав пробы, но и измерять их содержание, т. е. одновременно осуществлять и качественный, и количественный анализ.

В основе капиллярного электрофореза лежат электрокинетические явления: электромиграция и электроосмос. Эти явления возникают в растворах при помещении их в электрическое поле, преимущественно высокого напряжения. Если раствор находится в тонком капилляре, например в кварцевом, то электрическое поле, наложенное вдоль капилляра, вызывает в нем движение заряженных частиц (электромиграцию) и пассивный поток жидкости (электроосмос). Поскольку каждый вид ионов характеризуется своей скоростью миграции, проба сложного состава разделяется на отдельные зоны индивидуальных компонентов.

Метод капиллярного электрофореза сегодня с успехом применяется для определения разнообразных веществ (неорганических и органических катионов и анионов, аминокислот, витаминов, наркотиков, красителей, белков и т. д.) в объектах различной природы (для контроля качества вод и напитков, технологического контроля производства, входного контроля сырья, анализа фармацевтических препаратов и пищевых продуктов, в криминалистике, медицине, биохимии и т. д.).

Традиционно капиллярный электрофорез сравнивают с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), поскольку в обоих методах разделение происходит в ограниченном пространстве (капилляре или колонке) с участием движущейся жидкой фазы (фоновое электролита или подвижной фазы (элюента)), и для регистрации сигналов используют схожие принципы детектирования и программы обработки данных. Тем не менее у методов есть отличия, главное из которых — движущая сила разделения: в случае ВЭЖХ это распределение частиц между подвижной и неподвижной фазами, а в КЭ — миграция заряженных частиц в электрическом поле. К преимуществам КЭ по сравнению с ВЭЖХ относятся:

- высокая эффективность разделения;
- малый объем анализируемой пробы и рабочих растворов (1–2 мл в день), при этом практически не требуется применение высокочистых, дорогостоящих органических растворителей;
- отсутствие колонки, сорбента, проблем с его старением и, значит, заменой колонки;
- простая аппаратура;
- экспрессность и низкая себестоимость единичного анализа.

Из ограничений КЭ следует отметить невысокую, по сравнению с ВЭЖХ, концентрационную чувствительность и воспроизводимость результатов.

В России работы, связанные с изучением возможностей метода КЭ и его аналитических приложений, стали появляться лишь в последние годы, что во многом обусловлено созданием отечественных приборов для капиллярного электрофореза. Наиболее широкое распространение получили системы капиллярного электрофореза «Капель» различных модификаций, выпускаемые фирмой «Люмэкс» (г. Санкт-Петербург).

Системы капиллярного электрофореза «Капель» предназначены для количественного и качественного определения состава проб веществ в водных и водно-органических растворах методом капиллярного электрофореза. На приборах любой из модификаций могут быть реализованы методики, использующие различные варианты КЭ — для определения как ионного, так и молекулярного состава проб.

Физико-химические основы метода капиллярного электрофореза. Электрофорезом называется движение коллоидных частиц в растворе под действием внешнего электрического поля. Явление электрофореза было обнаружено в 1809 г. в опытах Федора Федоровича Рейсса и Петра Ивановича Страхова. Только в 30-х гг. XX в. Арне Тизелиусом была показана возможность использования этого явления для разделения белков сыворотки крови. Он поместил смесь белков в U-образную стеклянную трубку, заполненную буферным раствором, и при наложении электрического поля обнаружил, что компоненты пробы мигрируют в направлениях и со скоростью, определяемыми их размером, формой и электрическим зарядом. В 1948 г. эта работа была удостоена Нобелевской премии по химии. Главным ограничением широкого использования метода была низкая эффективность разделения из-за тепловых эффектов и конвекции жидкости, что приводило к размыванию и перемешиванию зон компонентов. Эта проблема была частично решена благодаря использованию неконвективной среды (полиакриламидные гели) в гель-электрофорезе. Несмотря на то, что разделение в геле довольно широко распространено, особенно в биохимии, очевидны и его ограничения: длительное время анализа, недостаточная эффективность, трудности при детектировании и автоматизации.

В 1967 г. шведский ученый Стеллан Хиртен предложил проводить электрофоретическое разделение не на плоскости, а в открытых трубках — капиллярах с внутренним диаметром 1–5 мм, тем самым положив начало методу капиллярного электрофореза. Позже Рауно Виртанен и Франс Миккерс использовали стеклянные и тефлоновые капилляры с внутренним диаметром 200 мкм, и, наконец, в начале 80-х гг. XX в. Джеймс Йоргенсон и Криинн Лукакс продемонстрировали возможности кварцевых капилляров с внутренним диаметром 75 мкм, прозрачных в ультрафиолетовой области спектра. Такие капилляры уже использовались в газовой хроматографии. С этого момента начинается активное развитие капиллярного электрофореза в его современном формате, продолжающееся по настоящее время.

Процесс анализа методом КЭ выглядит следующим образом. Небольшой объем анализируемого раствора (около 2 нл) вводят

в кварцевый капилляр, предварительно заполненный подходящим фоновым электролитом (обычно — буферным раствором). После подачи высокого напряжения (до 30 кВ) к концам капилляра ионы пробы начинают двигаться с разной скоростью, зависящей, в первую очередь, от их заряда и ионного радиуса, и, соответственно, в разное время достигают зоны детектирования. Детектор измеряет какое-либо свойство раствора, протекающего в капилляре, например оптическую плотность. График зависимости этого свойства от времени называется электрофореграммой (ЭФГ). В КЭ электрофореграмма обычно представляет собой последовательность пиков; качественной характеристикой вещества является время миграции, а количественной — высота или площадь пика, пропорциональная концентрации вещества (рис. 30). Обработка данных и вычисление результатов анализа проводятся автоматически.

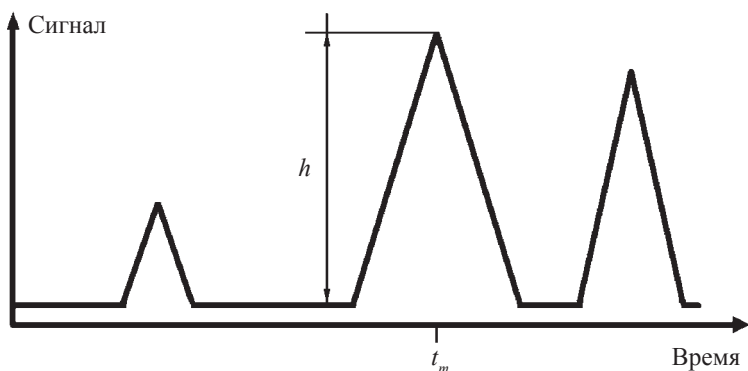


Рис. 30. Электрофореграмма:
 t_m — время миграции; h — высота пика

Наиболее распространенным и самым простым вариантом капиллярного электрофореза является капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ), при котором ионы, входящие в состав пробы, разделяются благодаря разнице в скоростях миграции к катоду или аноду. При этом состав фонового электролита, в котором проводят разделение, значение pH и напряженность поля во всем пространстве разделения остаются постоянными.

В других вариантах КЭ в разделение аналитов могут вносить вклад и другие факторы. Так, например, в мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) разделение основано на комбинации электрофоретического и хроматографического принципов. В состав фонового электролита вводят какое-либо поверхностно-активное вещество, которое образует псевдостационарную мицеллярную фазу, и молекулы пробы распределяются между ней и раствором электролита согласно их гидрофобности. Таким образом, становится возможным определять вещества, не образующие ионов в растворе. Этот метод является частным случаем электрокинетической хроматографии (ЭКХ), где в качестве добавок к раствору фонового электролита выступают самые разные соединения, но с обязательным образованием псевдостационарной фазы, которая взаимодействует с аналитом. Если в разделении участвуют две фазы: неподвижная (стационарная) фаза заполняет капилляр или покрывает его стенки, а подвижная жидкая фаза перемещается через него под действием электрического поля, то такой метод разделения называется капиллярной электрохроматографией (КЭХ). При заполнении капилляра гелем разделение частиц определяется главным образом разницей в их размерах — так реализуется метод капиллярного гель-электрофореза (КГЭ).

Рассмотрим подробнее процессы, протекающие в капилляре при анализе методом КЗЭ. Находящиеся на поверхности плавленого кварца силоксановые группы при контакте с водой или водными растворами гидролизуются с образованием удвоенного количества силанольных групп, которые затем гидратируются и диссоциируют (рис. 31).

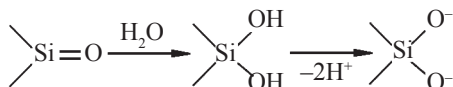


Рис. 31. Схема гидролиза силоксановых групп на поверхности кварцевого капилляра

Скорость и степень гидролиза зависят от температуры, pH и концентрации раствора, заполняющего капилляр. Константа

диссоциации кремниевой кислоты по первой ступени составляет $2,5 \cdot 10^{-3}$. Это означает, что при $\text{pH} > 2,6$ поверхность кварца приобретает некоторый отрицательный заряд, который возрастает при увеличении pH раствора. Наоборот, при $\text{pH} < 2$ диссоциация силанольных групп практически полностью подавлена и поверхность кварца становится нейтральной.

Диссоциация силанольных групп вызывает на границе раздела кварц — водный раствор электролита образование двойного электрического слоя (ДЭС) [Зимон, Лещенко, с. 111]. Первую его обкладку составляют неподвижные отрицательно заряженные силанольные группы. Вторую обкладку двойного слоя составляют положительно заряженные катионы в растворе. Диэлектриком, разделяющим обкладки этого конденсатора, являются молекулы воды, гидратирующие как силанольные группы, так и катионы (рис. 32).

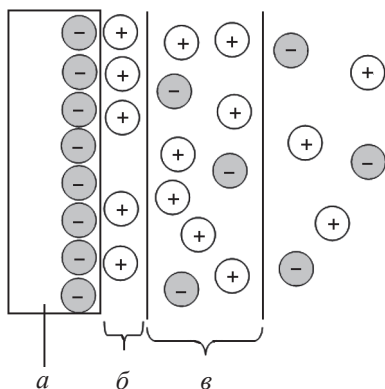


Рис. 32. Схема двойного электрического слоя у поверхности кварцевого капилляра:

а — стенка капилляра с диссоциированными силанольными группами;
б — плотный слой; *в* — диффузный слой

Положительная часть ДЭС, в свою очередь, делится на две части: неподвижную, непосредственно примыкающую к поверхности кварца, и диффузную, располагающуюся на некотором удалении от поверхности. В неподвижной части количество положительных зарядов меньше, чем отрицательных зарядов на поверхности кварца

из-за увеличения размеров катионов вследствие гидратации. В результате в диффузной части ДЭС образуется некоторая избыточная концентрация катионов. Между этими двумя слоями проходит так называемая граница скольжения — при наложении вдоль капилляра электрического поля неподвижная часть остается на месте, в то время как диффузная часть начинает мигрировать к катоду, увлекая за собой в силу межмолекулярного сцепления всю массу жидкости в капилляре. Возникает электроосмотический поток (ЭОП), который осуществляет пассивный перенос раствора внутри капилляра. Скорость ЭОП сильно зависит от кислотности раствора: в сильнокислых растворах ЭОП отсутствует, а при переходе в нейтральную и щелочную область рН скорость ЭОП возрастает. Также эта величина зависит от концентрации электролита в ведущем электролите: чем она больше, тем выше становится доля катионов в плотной части ДЭС, а толщина диффузной части уменьшается и, соответственно, уменьшается скорость ЭОП.

Уникальное свойство ЭОП в методах КЭ заключается в плоском профиле потока (в отличие от параболического в ВЭЖХ), который при движении зон компонентов внутри капилляра практически не вызывает их уширения (рис. 33). Благодаря этому метод КЭ характеризуется высочайшей эффективностью разделения (сотни тысяч теоретических тарелок).

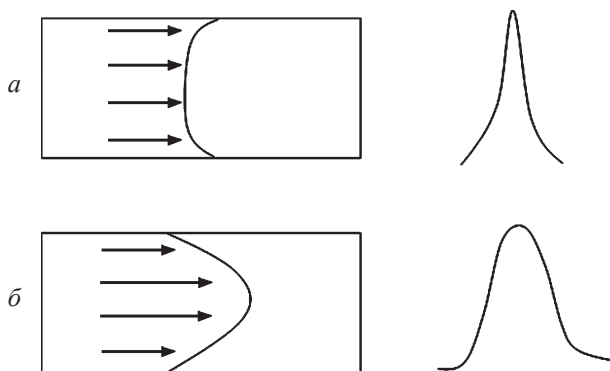


Рис. 33. Влияние профиля потока на ширину зоны вещества:
a — электроосмотический поток в КЭ; *б* — ламинарный поток в ВЭЖХ

При подаче на электроды высокого напряжения в капилляре быстро устанавливается стационарное состояние: через капилляр протекает постоянный электроосмотический поток, на который накладывается взаимно противоположная электромиграция катионов и анионов. Если в капилляр со стороны анода ввести небольшой объем раствора пробы, то ЭОП будет переносить эту зону к катоду (в область детектирования). Катионные компоненты пробы, двигаясь к катоду, будут обгонять электроосмотический поток, поэтому на выходе капилляра они появляются первыми. Нейтральные компоненты пробы способны перемещаться только под действием электроосмотического потока, тогда как анионные будут перемещаться к аноду со скоростями меньшими, чем скорость ЭОП. Медленно мигрирующие анионы появятся на выходе после ЭОП, а те, чья скорость электромиграции по абсолютной величине превышает скорость ЭОП, будут выходить из капилляра в прианодное пространство.

Таким образом, скорость движения иона является суммой его собственной электрофоретической скорости $v_{\text{эф}}$ и скорости ЭОП $v_{\text{ЭОП}}$:

$$v = v_{\text{эф}} + v_{\text{ЭОП}}.$$

Величина $v_{\text{эф}}$ зависит от эффективного поверхностного заряда z частицы и ее эффективного радиуса a (суммы ионного радиуса и толщины гидратной оболочки):

$$v_{\text{эф}} = \frac{zE}{6\pi a \eta}.$$

Чаще скорость миграции частицы характеризуют подвижностью, численно равной скорости частицы в поле единичной напряженности. Величину эффективной подвижности частицы определяют из экспериментальных данных и выражают в $\text{м}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{L_{\text{эфф}} L_{\text{общ}}}{t_m U},$$

где $L_{\text{общ}}$ — общая длина капилляра (от входного до выходного конца), м; $L_{\text{эфф}}$ — эффективная длина капилляра (от входного конца до детектора), м; t_m — время миграции иона от зоны ввода пробы до зоны детектирования, с; U — разность потенциалов, В.

Состав и концентрацию фонового электролита выбирают таким образом, чтобы поддерживать нужное значение pH раствора и необходимую электропроводность в течение всего времени анализа. Поскольку фоновый электролит находится в непосредственном контакте с электродами, то при приложении высокого напряжения он подвергается электролизу. В капиллярном электрофорезе стараются использовать такие составы буферных ведущих электролитов, чтобы на электродах происходило разложение воды. На катоде происходит восстановление ионов водорода, выделение на поверхности катода молекулярного водорода и образование в прикатодном пространстве гидроксильных ионов. На аноде — окисление гидроксильных ионов, выделение на поверхности молекулярного кислорода и образование в прианодном пространстве ионов водорода.

На катоде: $2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e} \rightarrow \text{H}_2\uparrow + 2\text{OH}^-$;

на аноде: $2\text{OH}^- - 2\text{e} \rightarrow \text{O}_2\uparrow + 2\text{H}^+$.

Образующиеся и гидроксильные и водородные ионы нейтрализуются буферными компонентами ведущего электролита. Таким образом, в приэлектродных пространствах происходит изменение мольного соотношения компонентов буферной смеси, приводящее лишь к незначительному изменению pH раствора. С течением времени концентрации компонентов фонового электролита значительно изменяются, он теряет свою буферную емкость, поэтому для получения воспроизводимых результатов необходимо регулярно обновлять раствор фонового электролита в рабочих пробирках.

Ц е л ь р а б о т ы: изучить возможности метода капиллярного электрофореза при аналитическом определении аминокислот в биологических пробах (на примере кормовых добавок).

О б о р у д о в а н и е и м а т е р и а л ы

Система капиллярного электрофореза «Капель 105М» с источником высокого напряжения положительной полярности (катод располагается вблизи выходного конца капилляра, анод — у входа капилляра); весы лабораторные типа ВЛР-200; мерные колбы вместимостью 25 мл; пипетки или дозаторы вместимостью 0,1–1,0 мл и 1–5 мл; центрифуга лабораторная; стаканы химические

вместимостью 50 мл; пробирки одноразовые типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 мл; шприц медицинский одноразовый типа «Луер» вместимостью 5–10 мл; фильтры целлюлозно-ацетатные с размером пор 0,2–0,45 мкм; исходные растворы аминокислот (лизина моногидрохлорида, треонина, метионина, триптофана) с массовой концентрацией 1 г/л; раствор тетрабората натрия с молярной концентрацией 0,02 моль/л; раствор соляной кислоты с молярной концентрацией 1 моль/л; раствор гидроксида натрия с молярной концентрацией 0,5 моль/л; деионизованная вода.

Метод измерений: основан на растворении пробы в деионизованной воде, введении полученного раствора в капилляр, разделении аминокислот под действием электрического поля и детектировании их по собственному поглощению при длине волны 200 нм.

Описание экспериментальной установки

Используемая в данной работе система капиллярного электрофореза «Капель 105М» (рис. 34) оснащена фотометрическим детектором и микролинзовой фокусирующей системой [Комарова, Каменцев, с. 28].

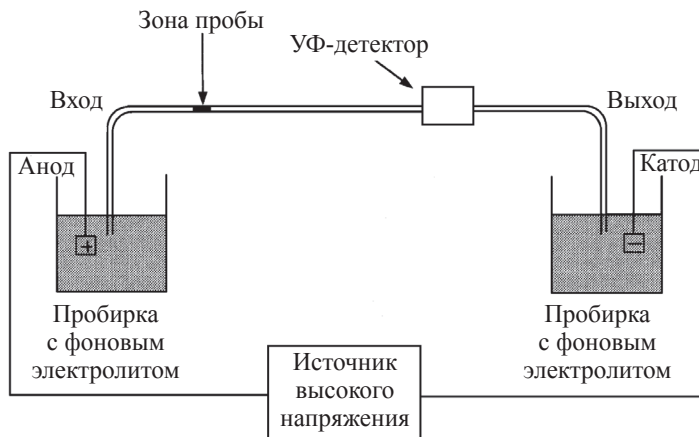


Рис. 34. Схема системы капиллярного электрофореза

В качестве источника света используется дейтериевая лампа, а в качестве диспергирующего элемента — дифракционный монохроматор со спектральным диапазоном 190–380 нм. Такой диапазон позволяет

выбрать длину волны детектирования, наиболее чувствительную к целевым компонентам. Кварцевый капилляр имеет общую длину 60 см, эффективную длину 50 см и внутренний диаметр 75 мкм. Способы ввода пробы: гидродинамический (давлением до 99 мбар), электрокинетический (при напряжении до 25 кВ). Система водяного термостатирования обеспечивает поддержание постоянной температуры капилляра в диапазоне от температуры на 10 °С ниже температуры окружающей среды до плюс 50 °С. Управление прибором, сбор и обработка данных производятся с помощью специализированного программного обеспечения «Эльфран».

Ход работы

1. Приготовление градуировочной смеси.

В мерную колбу вместимостью 25 мл вносят дозаторами или пипетками 10,0 мл исходного раствора лизина, 0,5 мл раствора триптофана, 2,5 мл раствора метионина и 5,0 мл раствора треонина, доводят до метки деионизованной водой и перемешивают.

2. Подготовка капилляра к работе.

Перед началом работы капилляр промывают последовательно деионизованной водой, раствором гидроксида натрия, водой и раствором фонового электролита (в качестве которого используют раствор тетрабората натрия с молярной концентрацией 0,02 моль/л). Длительность каждого этапа — 5 минут.

3. Градуировка системы.

Перед анализом все растворы дегазируют центрифугированием в течение 5 минут при 5 000 об./мин. Анализируют градуировочную смесь при следующих параметрах: ввод пробы гидродинамический в течение 10 секунд при давлении 30 мбар, длина волны детектирования 200 нм, напряжение +25 кВ, температура 30 °С, время анализа 10 минут. Регистрируют две ЭФГ. Между анализами капилляр промывают раствором фонового электролита в течение 5 минут.

На полученных ЭФГ размечают четыре пика, соответствующие (в порядке выхода) лизину, триптофану, метионину и треонину. Определяют времена миграции, высоты и площади пиков и строят градуировочный график, используя ПО «Эльфран».

4. Выполнение измерений.

Пробу для анализа измельчают и тщательно перемешивают. Навеску пробы массой 0,05 г растворяют в деионизованной воде

в мерной колбе вместимостью 50 мл и доводят водой до метки. Перед анализом пробу разбавляют в 10 раз, помещают 0,5–1,0 мл ее в пробирку типа «Эппендорф» и центрифугируют.

Анализируют пробу при тех же условиях, что и градуировочную смесь. Проводят два параллельных определения. Обрабатывают ЭФГ и рассчитывают содержание аминокислот в смеси, используя ПО «Эльфоран».

Обработка результатов измерений

Массовую долю аминокислоты в пробе (W , %) рассчитывают по формуле

$$W = \frac{C \cdot V}{m} \cdot K \cdot 100,$$

где C — найденная массовая концентрация аминокислоты в растворе, мг/л; V — объем раствора пробы, л; m — масса навески образца, г; K — коэффициент разбавления пробы.

Сделайте выводы и ответьте на вопросы:

1. Каково строение двойного электрического слоя?
2. Что такое электрофорез и электроосмос?
3. Капиллярный электрофорез. Основы метода и его практическое применение.
4. Преимущества и недостатки капиллярного электрофореза.
5. Факторы, влияющие на подвижность ионов в методе КЗЭ.
6. Устройство системы капиллярного электрофореза, основные блоки и их назначение.

ПРИМЕРНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЭКЗАМЕНУ ПО КУРСУ «БИОФИЗИКА»

.
. .
.

Тема 1. Биофизика сложных систем. Термодинамика биологических процессов

1. Основные понятия термодинамики.
2. Внутренняя энергия, теплота и работа. Эквивалентность теплоты и работы.
3. Закон сохранения и превращения энергии. Работа расширения (сжатия) и максимально полезная работа (δA).
4. Первый закон термодинамики. Определения.
5. Внутренняя энергия как функция состояния. Круговой процесс.
6. Первый закон термодинамики в живых системах. Закон Гесса.
7. Понятие об энтальпии («теплосодержание»).
8. Понятие об энтропии. Вывод энтропии при помощи цикла Карно.
9. Второй закон термодинамики. Формулировки.
10. Свойства энтропии. Энтропия как критерий направленности.
11. Объединенное уравнение первого и второго законов термодинамики. Фундаментальное уравнение Гиббса.
12. Энергия Гельмгольца.
13. Энергия Гиббса.
14. Второй закон термодинамики в открытых системах.
15. Энтропия открытой системы ($d_i S$) и скорость ее возникновения.
16. Химический потенциал.
17. Вывод выражения для полезной химической работы.
18. Химическое сродство и сопряжение процессов.
19. Понятие о диссипативной функции.
20. Соотношения Онзагера.
21. Теорема Пригожина.

22. Отличительные признаки стационарного и равновесного состояний.

23. Биологические приложения термодинамики.

Тема 2. Атомная физика и квантовая механика в применении к биологическим системам

1. Ядерная модель атома Резерфорда. Постулаты Бора.
2. Фотобиологические процессы. Классификация.
3. Общая схема фотобиологических процессов.
4. Электронные переходы в молекулах. Синглетное и триплетное состояния.
5. Электронные переходы в молекулах. Внутренняя конверсия.
6. Люминесценция. Типы люминесценции.
7. Механизмы люминесценции.
8. Флуо- и фосфоресценция.
9. Закон Стокса. Выход люминесценции.
10. Люминесценция в биологии и медицине. Макро- и микро-анализ.
11. Люминесценция в биологии и медицине. Флуоресцентные зонды и метки.
12. Радиоактивность. История изучения.
13. Состав радиоактивного излучения (α , β , γ).
14. Строение атомных ядер. Изотопы.
15. Теория радиоактивного распада.
16. Период полураспада и активность.
17. Основные виды радиоактивного распада: α -распад.
18. Основные виды радиоактивного распада: β^- -распад.
19. Основные виды радиоактивного распада: β^+ -распад.
20. Основные виды радиоактивного распада: электронный захват.
21. Гамма-излучение.
22. Естественная и искусственная радиоактивность. Радиоактивные ряды.
23. Использование радионуклидов в медицине.
24. Биофизические основы действия ионизирующего излучения.
25. Общие закономерности биологической стабильности.

26. Дозиметрия: поглощенная доза, эквивалентная доза, экспозиционная доза.

27. Мощность доз. Единицы измерения.

28. Понятие предельно допустимой (эквивалентной) дозы (ПДД).

Тема 3. Молекулярная биофизика

1. Основные функции белков.

2. Строение белковых молекул. Первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры.

3. Ковалентные связи: пептидная связь.

4. Ковалентная связь: дисульфидная связь.

5. Ковалентная связь: координационная связь.

6. Нековалентные типы связей: силы Ван-дер-Ваальса.

7. Нековалентные типы связей: ионная связь.

8. Нековалентные типы связей: водородная связь.

9. Нековалентные типы связей: гидрофобные взаимодействия.

10. «Мотив укладки» белковой цепи.

11. Условия стабильности белковых структур.

12. Вероятность (встречаемость) структурного элемента в белковой глобуле.

13. Статистика аминокислотных последовательностей в белке.

14. Переход «клубок — глобула». Условия существования клубка и глобулы.

15. Переход «клубок — глобула». Энергия взаимодействия звеньев.

16. Термодинамические характеристики перехода «клубок — глобула».

17. Фазовые переходы. Температурная денатурация. Теплоемкость и энтальпия плавления.

18. Температурная денатурация. Термодинамические параметры перехода «клубок — глобула».

19. Температурная денатурация. Кооперативный характер перехода.

Тема 4. Биофизика клетки

1. Строение биологических мембран.

2. Липиды клеточных мембран.
3. Белки клеточных мембран.
4. Модели строения биологических мембран.
5. Физико-химические модели клеточных мембран.
6. Жидкокристаллическое состояние мембран.
7. Ключевые свойства и функции клеточных мембран.
8. Пассивный транспорт и активный транспорт.
9. Физико-химический градиент.
10. Свободная диффузия липофильных веществ. Уравнение Фика.
11. Облегченная диффузия гидрофильных молекул. Феномен насыщения.
12. Электродиффузия. Электрохимический потенциал.
13. Уравнения Теорелла и Нернста — Планка. Ионные каналы.
14. Натрий-калиевый насос: механизм работы и значение.
15. Микроструктура саркомера.
16. Процесс активации мостика и генерация усилия в саркомере.
17. Модель скользящих нитей.
18. Мышца как вязкоупругая среда. Основные понятия механики сплошных сред.
19. Трехкомпонентная модель Хилла для мышцы.
20. Активное сокращение мышцы: изометрический и изотонический режимы.
21. Уравнение Хилла.
22. Модель Дещеревского.
23. Электромеханическое сопряжение в мышцах.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

Блохина М. Е., Эссаулова И. А., Мансурова Г. В. Руководство к лабораторным работам по медицинской и биологической физике : учеб. пособие. 3-е изд., стереотип. М. : Дрофа, 2002. 288 с.

Зимон А. Д., Леценко Н. Ф. Коллоидная химия. Поверхностные явления и дисперсные системы. М. : Химия, 2001. 320 с.

Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ». СПб. : ВЕДА, 2006. 213 с.

Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. Физика белка : курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями. М. : Кн. дом «Университет», 2002. 376 с.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Антонов В. Ф. Биофизика : учебник для студ. высш. учеб. заведений / В. Ф. Антонов, А. М. Черныш, В. И. Пасечник и др. М. : Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2006. 288 с.

Артюхов В. Г. Биофизика : учебник для вузов / В. Г. Артюхов, Т. А. Ковалева, М. А. Наквасина и др. Екатеринбург : Изд-во «Деловая книга», 2009. 294 с.

Бегун П. И. Биомеханика : учебник для вузов / П. И. Бегун, Ю. А. Шукейло. СПб. : Политехника, 2000. 463 с.

Блохина М. Е. Руководство к лабораторным работам по медицинской и биологической физике : учеб. пособие. 2-е изд., стереотип. / М. Е. Блохина, И. А. Эссаулова, Г. В. Мансурова. М. : Дрофа, 2002. 288 с.

Волькенштейн М. В. Биофизика / М. В. Волькенштейн. М. : Наука, 1981. 592 с.

Воюцкий С. С. Курс коллоидной химии : учебник / С. С. Воюцкий. М. : Высш. шк., 1975. 512 с.

Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции : пер. с англ. / Р. Геннис. М. : Мир, 1997. 624 с.

Жорина Л. В. Основы взаимодействия физических полей с биологическими объектами / Л. В. Жорина, Г. Н. Змиевской. М. : Изд-во МГТУ им. Баумана, 2006. 240 с.

Зимон А. Д. Коллоидная химия. Поверхностные явления и дисперсные системы / А. Д. Зимон, Н. Ф. Лещенко. М. : Химия, 2001. 320 с.

Календер В. Компьютерная томография: основы, техника, качество изображений и области клинического использования / В. Календер ; пер. А. В. Кирюшина ; под ред. В. Е. Сеницына. М. : Техносфера, 2006. 344 с.

Комарова Н. В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ» / Н. В. Комарова, Я. С. Каменцев. СПб. : ВЕДА, 2006. 213 с.

Марусина М. Я. Современные виды томографии / М. Я. Марусина, А. О. Казначеева. СПб. : СПбГУ ИТМО, 2006. 132 с.

Панич Р. М. Практикум по коллоидной химии и электронной микроскопии / Р. М. Панич, С. С. Воюцкий. М. : Химия, 1974. 224 с.

Пригожин И. Порядок из хаоса : пер с англ. / И. Пригожин, И. Стенгерс. М. : «Едиториал УРСС», 2002. 312 с.

Рубин А. Б. Биофизика : учебник для вузов : в 2 т. 3-е изд., испр. и доп. / А. Б. Рубин. М. : Наука, 2004.

Самойлов В. О. Медицинская биофизика : учебник / В. О. Самойлов. СПб. : Спецлит, 2004. 496 с.

Сидоренко В. М. Молекулярная спектроскопия биологических сред : учеб. пособие / В. М. Сидоренко. М. : Высш. шк, 2004. 191 с.

Финкельштейн А. В. Физика белка : курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями / А. В. Финкельштейн, О. Б. Птицын. М. : Кн. дом «Университет», 2002. 376 с.

Фролов Ю. Г. Лабораторные работы и задачи по коллоидной химии / Ю. Г. Фролов, А. С. Гродский. М. : Химия, 1986. 216 с.

Учебное издание

Арташян Ольга Сергеевна
Мищенко Владимир Алексеевич
Лебедева Елена Леонидовна

БИОФИЗИКА

Учебно-методическое пособие

Заведующий редакцией
Редактор
Корректор
Оригинал-макет

*М. А. Овечкина
С. Г. Галинова
С. Г. Галинова
Л. А. Хухаревой*

Подписано в печать 05.09.2019. Формат 60 × 84^{1/16}.
Бумага офсетная. Цифровая печать. Усл. печ. л. 6,74.
Уч.-изд. л. 5,3. Тираж 40 экз. Заказ 154

Издательство Уральского университета
Редакционно-издательский отдел ИПЦ УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4
Тел.: +7 (343) 389-94-79, 350-43-28
E-mail: rio. marina. ovehkina@mail. ru

Отпечатано в Издательско-полиграфическом центре УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4
Тел.: +7 (343) 358-93-06, 350-58-20, 350-90-13
Факс: +7 (343) 358-93-06
<http://print.urfu.ru>

Для заметок

Для заметок

